



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Leishmaniose canina: Comparação de resultados ELISA em diferentes grupos terapêuticos**

**Renata Rafaela Louro da Graça Carmona**

Orientação: Nuno Miguel Lourenço Alexandre

Paula Brilhante Simões

**Mestrado em Medicina Veterinária**

Dissertação de natureza científica

Évora, 2017



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Leishmaniose canina: Comparação de resultados ELISA em diferentes grupos terapêuticos**

**Renata Rafaela Louro da Graça Carmona**

Orientação: Nuno Miguel Lourenço Alexandre

Paula Brilhante Simões

**Mestrado em Medicina Veterinária**

Dissertação de natureza científica

Évora, 2017

### **Agradecimentos**

Aos meus queridos pais: por todo o apoio que me dão, por sempre acreditarem em mim e por fazerem todos os possíveis e impossíveis para eu concretizar os meus sonhos. Sem vocês, nada disto seria possível. Amo-vos muito e obrigado por tudo.

Ao meu Orientador, Dr. Nuno Alexandre, pelos conselhos e linhas orientadoras que me deu ao longo da realização do estágio e da tese. Obrigado.

À minha orientadora externa, Dr.<sup>a</sup> Paula Brilhante: por me acompanhar e aconselhar durante o estágio, pelos conhecimentos transmitidos e por toda a ajuda que me deu. Obrigado.

Ao Dr. Augusto Silva e ao Dr. Ricardo Lopes: pela paciência, ideias e ajuda que me deram ao longo do estágio e na realização da tese. Obrigado

A toda a equipa do Laboratório INNO: pelas ideias que me deram, pelos conhecimentos transmitidos, pela boa disposição e o incentivo que me deram ao longo deste tempo. Obrigada a todos.

Ao meu namorado David Maia: por me acompanhar ao longo destes 6 anos, sempre encorajador e ouvinte das minhas queixas e alegrias, e por ser meu conselheiro e amigo em todos os momentos. Amo-te muito.

Às minhas amigas: obrigado por me “aturarem” ao longo destes anos, pelas sessões de estudo em conjunto e pela amizade e cumplicidade que sempre demonstraram. Boa sorte para todas e obrigado por tudo.

## **Resumo**

A Leishmaniose é uma zoonose com distribuição mundial causada por protozoários do género *Leishmania spp.*. Esta é transmitida principalmente por vetores flebótomos, que se alimentam de um hospedeiro reservatório e o transmitem a outros animais e ao Homem.

Este estudo foi realizado durante o estágio curricular no laboratório veterinário INNO. Neste recolheram-se dados relativos a 251 cães, que realizaram testes de *ELISA* para deteção de anticorpos anti-*Leishmania*. Após selecionar os positivos (170), enviou-se um inquérito aos médicos veterinários dos CAMV's para obter dados clínicos (sinais clínicos, métodos de diagnóstico e terapêutica efetuada). Após o cruzamento de dados (do laboratório e dos inquéritos), associaram-se os animais em 15 grupos consoante os protocolos terapêuticos utilizados e compararam-se os resultados serológicos em dois momentos distintos (ao diagnóstico e após o início da terapêutica). Observou-se que o grupo que apresentou melhorias mais significativas foi "Outros", e que alguns grupos tiveram agravamento dos resultados.

Palavras-chave: Leishmaniose; Cão; *ELISA*; laboratório; terapêutica.

**Title:** Canine Leishmaniasis: Comparison between ELISA results in different therapeutic groups

### **Abstract**

Leishmaniasis is a zoonosis with a global distribution caused by protozoa of the genus *Leishmania spp.* This is transmitted mainly by sandfly vectors, which feed on a reservoir host and transmit it to other animals and humans.

This study was carried out during the internship at the INNO veterinary laboratory. Data were collected from 251 dogs, which performed *ELISA* tests for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. After selecting the positives (170), an survey was carried out with several practices/ veterinary hospitals to obtain clinical data (clinical signs, diagnostic methods and therapeutics performed). After the data were crossed (from the laboratory and from the surveys), the animals were associated in 15 groups according to the therapeutic protocols used and the serological results were compared at two different moments (at diagnosis and after initiation of therapy). It was observed that the group that presented the most significant improvements was "Others", and that some groups had worse results.

Keywords: Leishmaniasis; Dog; *ELISA*; laboratory; therapeutic.

## Índice Geral

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Title: Canine Leishmaniasis: Comparison between <i>ELISA</i> serological results in different therapeutic groups.....	III
Abstract.....	III
Índice Geral.....	IV
1. Introdução.....	1
1.1 Epidemiologia.....	1
1.1.1 Leishmaniose humana.....	1
1.1.2 Leishmaniose canina.....	3
1.1.2.1 Etiologia.....	4
1.1.2.1.1 Transmissão e Vetor Invertebrado.....	4
1.1.2.1.1.1 Outros vetores.....	6
1.1.2.1.1.2 Outros tipos de transmissão.....	7
1.1.2.1.2 Hospedeiros vertebrados.....	7
1.1.2.1.3 Parasita <i>Leishmania spp.</i> .....	9
1.1.2.2 Ciclo de vida.....	10
1.1.2.3 Patogénese e Resposta imunitária.....	12
1.1.2.3.1 Alterações Patológicas.....	15
1.1.2.4 Quadros clínicos.....	20
1.1.2.5 Diagnóstico.....	22
1.1.2.5.1 Clínico.....	22
1.1.2.5.2 Laboratorial.....	23
1.1.2.5.2.1 Alterações hematológicas:.....	25
1.1.2.5.2.2 Alterações da medula óssea.....	25
1.1.2.5.2.3 Alterações hemostáticas.....	25
1.1.2.5.2.4 Avaliação de parâmetros bioquímicos e outros.....	26
1.1.2.5.2.4.1 Avaliação da função hepática.....	26
1.1.2.5.2.4.2 Avaliação da função renal:.....	26
1.1.2.5.2.4.3 Alterações na urianálise.....	26
1.1.2.5.2.4.4 Avaliação da proteinúria.....	27
1.1.2.5.2.4.5 Avaliação das reações inflamatórias imunes.....	27
1.1.2.5.3 Métodos diretos.....	29

1.1.2.5.3.1 Citologia .....	29
1.1.2.5.3.2 Histologia: .....	29
1.1.2.5.3.3 Cultura de parasitas .....	30
1.1.2.5.3.4 Técnicas de PCR ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> ) .....	30
1.1.2.5.4 Métodos indiretos .....	31
1.1.2.5.4.1 Serologia: .....	31
1.1.2.5.4.1.1 Teste de imunofluorescência Indireta (IFI) .....	32
1.1.2.5.4.1.2 Teste de <i>ELISA</i> (Enzyme-linked immunosorbent assay) ....	33
1.1.2.5.4.1.3 Teste de Imunocromatografia .....	34
1.1.2.6 Terapêutica .....	34
1.1.2.6.1 Terapia convencional .....	36
1.1.2.6.1.1 Compostos Antimoniais ( $Sb^V$ ): .....	36
1.1.2.6.1.2 Miltefosina (Milteforan®): .....	37
1.1.2.6.1.3 Alopurinol (Zyloric®): .....	38
1.1.2.6.1.4 Domperidona: .....	39
1.1.2.6.1.5 Aminosidina: .....	40
1.1.2.6.1.6 Anfotericina B: .....	40
1.1.2.6.1.7 Marbofloxacin: .....	41
1.1.2.6.2 Terapia de Suporte .....	41
1.1.2.7 Prevenção .....	41
1.1.2.7.1 Vacinas .....	42
1.1.2.7.2 Controlo de vetores .....	44
2. Objetivos: .....	46
3. Materiais e métodos .....	46
3.1 Amostra: .....	46
3.1.1 Tipo de estudo .....	47
3.2 Colheita, receção e conservação das amostras .....	48
3.3 Realização da pesquisa de Ac anti- <i>Leishmania</i> , através da técnica de <i>ELISA</i> ...	48
3.4 Realização de análises bioquímicas aos parâmetros selecionados .....	50
3.5 Realização de proteinogramas .....	51
3.6 Seleção de animais positivos e envio de inquéritos: .....	51
3.7 Análise estatística .....	51
4. Resultados: .....	54
4.1 Caracterização da população: .....	54

4.2 Caracterização dos dados relativos aos inquéritos:.....	66
4.2.1 Sinais clínicos: .....	66
4.2.2 Métodos de diagnóstico.....	69
4.2.3 Protocolos terapêuticos aplicados .....	70
4.3 Associação estatística entre variáveis (dados de análises serológicas e os dados dos inquéritos).....	71
4.3.1 Grupos de terapêutica .....	73
4.3.1.1 Alopurinol:.....	73
4.3.1.2 Alopurinol e outros: .....	74
4.3.1.3 Alopurinol e Antimoniato de meglumina: .....	76
4.3.1.4 Alopurinol, Miltefosina e Imunomodeladores .....	77
4.3.1.5 Alopurinol, Antimoniato de meglumina e outros.....	78
4.3.1.6 Alopurinol, Antimoniato de meglumina e Imunomodeladores.....	79
4.3.1.7 Alopurinol, Miltefosina e outros .....	81
4.3.1.8 Miltefosina .....	82
4.3.1.9 Alopurinol, Antimoniato de meglumina e Derivados do Imidazol .....	83
4.3.1.10 Alopurinol, Miltefosina, Antimoniato de meglumina e outros .....	83
4.3.1.11 Alopurinol, Miltefosina, Antibióticos e outros .....	83
4.3.1.12 Antimoniato de meglumina .....	83
4.3.1.13 Alopurinol e Miltefosina .....	83
4.3.1.14 Alopurinol, Miltefosina e Antimoniato de meglumina.....	85
4.3.1.15 Outros .....	85
4.3.2 Comparação de médias entre T0 e T1 em diferentes grupos de terapêutica ..	86
5. Discussão.....	87
6. Conclusão .....	93
Bibliografia .....	94



## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Critérios de classificação de cães com Lcan, do <i>Canine Leishmaniasis Working Group</i> [58] .....	23
Tabela 2 – Estadiamento clínico de leishmaniose, segundo o grupo <i>Leishvet</i> . [60] .....	24
Tabela 3 – Guidelines <i>Leishvet</i> relativas à terapêutica em cada estágio de Lcan. ....	35
Tabela 4 – Valores de referência dos parâmetros selecionados, consoante o laboratório de referência .....	47
Tabela 5 – Interpretação dos resultados do kit <i>Leiscan® Leishmania ELISA test</i> , de acordo com o fabricante.....	50
Tabela 6– Frequência relativa (%) da distribuição de cães por raça.....	55
Tabela 7 – Distribuição de cães por nº de serologias realizadas. ....	57
Tabela 8 – Distribuição de animais consoante o sexo e positividade/negatividade no diagnóstico de Lcan. ....	58
Tabela 9 – Teste de Qui-quadrado.....	59
Tabela 10 – Distribuição de casos por parâmetros bioquímicos analisados e cálculo de medidas de localização e dispersão, consoante o diagnóstico. ....	60
Tabela 11 – Frequência relativa (%) da resposta de cada questão, relativa aos sinais clínicos. ....	67
Tabela 12 – Distribuição de respostas da questão “Outros”, por casos.....	68
Tabela 13 – Frequência relativa (%) da resposta de cada questão, relativa aos métodos de diagnóstico. ....	69
Tabela 14 – Frequência relativa (%) da resposta de cada questão, relativa aos fármacos utilizados. ....	71
Tabela 15 - Distribuição de respostas da questão “Outros”, por casos.....	71
Tabela 16 – Teste de normalidade Shapiro-Wilk para os dados serológicos dos grupos de terapêutica. ....	72
Tabela 17 - Análise descritiva do teste de t-Student .....	74
Tabela 18 – Resultados do teste de t-Student .....	74
Tabela 19 - Análise descritiva do teste de t-Student .....	75
Tabela 20 – Resultados do teste de t-Student .....	76
Tabela 21 – Análise descritiva do teste de t-Student. ....	77
Tabela 22 – Resultados do teste de t-Student .....	77
Tabela 23 – Análise descritiva do teste de t-Student .....	79
Tabela 24 – Resultados do teste de t-Student .....	79
Tabela 25 – Análise descritiva do teste de t-Student .....	80
Tabela 26 – Resultados do teste de t-Student .....	81
Tabela 27 – Análise descritiva do teste de t-Student .....	82
Tabela 28 – Resultados do teste de t-Student .....	82
Tabela 29 – Análise descritiva do teste de t-Student .....	84
Tabela 30 – Resultados do teste de t-Student .....	85

Tabela 1 – Critérios de classificação de cães com Lcan, do <i>Canine Leishmaniasis Working Group</i> [58] .....	23
Tabela 2 – Estadiamento clínico de leishmaniose, segundo o grupo <i>Leishvet</i> . [60] .....	24
Tabela 3 – Guidelines <i>Leishvet</i> relativas à terapêutica em cada estágio de Lcan. ....	35
Tabela 4 – Valores de referência dos parâmetros selecionados, consoante o laboratório de referência .....	47
Tabela 5 – Interpretação dos resultados do <i>kit Leiscan® Leishmania ELISA test</i> , de acordo com o fabricante.....	50
Tabela 6– Frequência relativa (%) da distribuição de cães por raça.....	55
Tabela 7 – Distribuição de cães por nº de serologias realizadas. ....	57
Tabela 8 – Distribuição de animais consoante o sexo e positividade/negatividade no diagnóstico de Lcan. ....	58
Tabela 9 – Teste de Qui-quadrado.....	59
Tabela 10 – Distribuição de casos por parâmetros bioquímicos analisados e cálculo de medidas de localização e dispersão, consoante o diagnóstico. ....	60
Tabela 11 – Frequência relativa (%) da resposta de cada questão, relativa aos sinais clínicos. ....	67
Tabela 12 – Distribuição de respostas da questão “Outros”, por casos.....	68
Tabela 13 – Frequência relativa (%) da resposta de cada questão, relativa aos métodos de diagnóstico. ....	69
Tabela 14 – Frequência relativa (%) da resposta de cada questão, relativa aos fármacos utilizados. ....	71
Tabela 15 - Distribuição de respostas da questão “Outros”, por casos.....	71
Tabela 16 – Teste de normalidade Shapiro-Wilk para os dados serológicos dos grupos de terapêutica. ....	72
Tabela 17 - Análise descritiva do teste de t-Student .....	74
Tabela 18 – Resultados do teste de t-Student .....	74
Tabela 19 - Análise descritiva do teste de t-Student .....	75
Tabela 20 – Resultados do teste de t-Student .....	76
Tabela 21 – Análise descritiva do teste de t-Student. ....	77
Tabela 22 – Resultados do teste de t-Student .....	77
Tabela 23 – Análise descritiva do teste de t-Student .....	79
Tabela 24 – Resultados do teste de t-Student .....	79
Tabela 25 – Análise descritiva do teste de t-Student .....	80
Tabela 26 – Resultados do teste de t-Student .....	81
Tabela 27 – Análise descritiva do teste de t-Student .....	82
Tabela 28 – Resultados do teste de t-Student .....	82
Tabela 29 – Análise descritiva do teste de t-Student .....	84
Tabela 30 – Resultados do teste de t-Student .....	85

## Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Frequência relativa (%) da distribuição de animais por sexo. ....	54
Gráfico 2–Distribuição dos animais por faixa etária (anos). ....	54
Gráfico 3 – Frequências absolutas da distribuição de amostras por distritos. ....	57
Gráfico 4 – Gráfico caixa de bigodes sobre resultados de análises ao parâmetro creatinina em T0. ....	61
Gráfico 5 - Gráfico caixa de bigodes sobre resultados de análises ao parâmetro alanina aminotransferase em T0. ....	62
Gráfico 6- Gráfico caixa de bigodes sobre os resultados de análises ao parâmetro proteínas totais em T0. ....	63
Gráfico 7- Gráfico caixa de bigodes sobre os resultados de análises ao parâmetro rácio albumina/globulina em T0. ....	64
Gráfico 8- Gráfico caixa de bigodes sobre os resultados de análises ao parâmetro globulinas beta em T0. ....	65
Gráfico 9- Gráfico caixa de bigodes sobre os resultados de análises ao parâmetro globulinas gama em T0. ....	65
Gráfico 10 - Distribuição de cães positivos no diagnóstico de Lcan, por mês. ....	66
Gráfico 11 – Número de animais consoante o número de sinais clínicos apresentados em T0. ....	68
Gráfico 12 – Número de animais consoante o número de métodos de diagnóstico utilizados em T0. ....	70
Gráfico 13– Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol. ....	73
Gráfico 14 – Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol e outros. ....	75
Gráfico 15 – Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol e Antimoniato de Meglumina. ....	76
Gráfico 16 – Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol, Antimoniato de meglumina e outros. ....	78
Gráfico 17 – Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol, Antimoniato de meglumina e Imunomodeladores. ....	80
Gráfico 18 – Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol, Miltefosina e outros. ....	81
Gráfico 19 – Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol e Miltefosina. ....	84

## Índice de Figuras

Figura 1 – Estádios de desenvolvimento dos Flebótomos. Adaptado de [13].....	6
Figura 2 – Formas amastigotas de <i>Leishmania spp.</i> (seta vermelha), em citologia de pele de um cão. Coloração <i>Diff-Quick</i> . Ampliação 1000x. Fotografia gentilmente cedida por laboratório veterinário INNO. ....	10
Figura 3 – Esquema representativo do ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i> .....	11
Figura 4 – Alopecia periocular e bleferite num cão com Lcan. Fotografia gentilmente cedida por Dr. Nuno Alexandre. ....	22
Figura 5 – Alopecia, descamação e úlcera em ponto de pressão do MPE. Fotografia gentilmente cedida por Dr. Nuno Alexandre. ....	22
Figura 6 – Exemplo de boletim de resultados de uma análise de proteinograma de um animal com Lcan. Fotografia gentilmente cedida por laboratório veterinário INNO. ....	28
Figura 7 – Fotografia de formas promastigotas de <i>Leishmania spp.</i> , detetadas por IFI. Ampliação 400x. [65] .....	33
Figura 8 – Etapa de execução de teste comercial <i>ELISA</i> : poços com rosa, azul e amarelo constituem os controlos do kit, enquanto poços a verde constituem as amostras suspeitas diluídas. Fotografia gentilmente cedida por laboratório veterinário INNO.....	33
Figura 9 – Uratos com cristais de xantina (castanhos) em exame de sedimento urinário. Ampliação 400x. Fotografia gentilmente cedida por laboratório veterinário INNO.....	39
Figura 10 - <i>Kit Leiscan® Leishmania ELISA test</i> , Esteve Farma. [110] .....	50
Figura 11 – Mapa de Portugal com distribuição de CAMVs por distrito. ....	56
Figura 12 – Mapa de Portugal continental com a distribuição de animais positivos e negativos por distrito. ....	58

### **Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos**

CAMV's – Centros de atendimento médico veterinários

CL – Leishmaniose Cutânea

LV – Leishmaniose Visceral

ELISA – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

PCR – Polimerase Chain Reaction

Lcan – Leishmaniose canina

CVBD – Doenças caninas transmitidas por vetores (*Canine vector-borne diseases*)

Ac - Anticorpos

IFI – Imunofluorescência Indireta

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ARN – Ácido Ribonucleico

mARN – Ácido Ribonucleico mensageiro

kADN – ADN do cinetoplasto

ex. - Exemplo

TNF – Factor de Necrose Tumoral

ALX – Receptor da Lipoxina

TGF- $\beta$  – Factor de transformação do crescimento beta

GP63 – Glicoproteína maior de superfície

NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

ATPase – Enzimas Adenosinatrifosfatases

MCP-1 – Proteína quimiotática para monócitos – 1

MHC-I – Complexo Maior de Histocompatibilidade classe I

MHC-II – Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II

CD8+ – Células T citotóxicas

CD4+ – Células T *helper*

CD21+ – Células de memória

Th – Células *T helper*

Th1 – Resposta imune T-helper tipo 1

Th2 – Resposta imune T-helper tipo 2

IL – Interleucina

INF- $\gamma$  – Interferão Gama

NOS2 – gene que induz a enzima óxido nítrico sintetase 2

NO – Óxido Nítrico

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IgA – Imunoglobulina A

HSP-70 – Proteína de choque de calor  
μl - microlitro  
CPA – Peptidase de Cisteína  
CPB – Peptidase de Cisteína  
K39 – Antígeno de *Leishmania*  
MPE – Membro posterior esquerdo  
AST – Aspartato Amino Transferase  
ALT – Alanina Amino Transferase  
FAS – Fosfatase Alcalina Sérica  
CID – Coagulação Intravascular Disseminada  
IRIS – International Renal Interest Society  
CRE – Creatinina  
BUN – Ureia nitrogenada sérica  
UPC – rácio proteína/creatinina urinária  
SDS – Dodecil Sulfato de sódio  
SDS-PAGE – Eletroforese no gel Poliacrilamida  
SDS-AGE - Eletroforese no gel Agarose  
GGT – Gamaglutamiltranspeptidase  
A/G – Rácio Albumina/Globulina  
qPCR – Polimerase Chain Reaction real-time  
QA – *Quillaja saponaria*  
QP – Proteína Q  
IgG1 - Imunoglobulina G isotipo 1  
IgG2 – Imunoglobulina G isotipo 2

## **1. Introdução**

As leishmanioses consistem num grupo de doenças parasitárias transmitidas por vetores, causadas por parasitas protozoários pertencentes ao género *Leishmania spp.*. Estas são transmissíveis entre homens e animais (zoonoses), constituindo um grande problema de saúde pública [1]. A sua transmissão é feita maioritariamente através da picada de flebótomos (do género *Phlebotomus spp.* no velho mundo e *Lutzomyia spp.* no novo mundo), mas cada vez mais surgem outras formas de transmissão que não implicam estes vectores.

São consideradas como “doenças tropicais negligenciadas”, uma vez que são associadas a populações pobres ou rurais com difícil acesso a meios de diagnóstico e terapêutica [1].

A incidência global destas doenças tem vindo a crescer devido ao progresso no diagnóstico, à deteção precoce de casos, ao melhoramento da comunicação de casos e à acessibilidade à terapêutica. Desta forma, é aceite que estas constituem doenças dinâmicas, cujas circunstâncias de transmissão estão constantemente a evoluir devido ao ambiente, aos fatores humanos comportamentais e geográficos, às alterações no habitat de hospedeiros e vectores, às condições imunossupressoras de cada hospedeiro e ainda como consequências de conflitos sociais [2].

Visto que a leishmaniose canina é considerada um tema tão desafiante, com muitas características ainda desconhecidas (relacionadas com a etiologia, patogenia, diagnóstico e terapêutica) e por Portugal ser um país endémico, surgiu a possibilidade de realizar um trabalho nesta área. Uma vez que o laboratório INNO, em Braga, recebe diariamente várias amostras de todo o país para realizar testes comerciais de *ELISA* (*Leiscan®*, para deteção de *Ac anti-Leishmania*), do ponto de vista da autora, este tornou-se a instituição ideal para a realização deste estudo.

### **1.1 Epidemiologia**

#### **1.1.1 Leishmaniose humana**

A leishmaniose humana é considerada endémica em 88 países (66 destes no novo mundo e 22 no velho mundo), afetando as populações mais pobres que vivem em áreas rurais ou suburbanas.

Estimam-se que estejam infetados aproximadamente 12 milhões de pessoas e que cerca de 350 milhões se encontrem em risco de adquirir a doença [3].

Existem dois tipos de doença consoante o vetor, hospedeiro e parasita: leishmanioses zoonóticas (tanto os animais domésticos como os selvagens contribuem para a transmissão, sendo os humanos considerados hospedeiros acidentais) e as leishmanioses antroponóticas (o homem é o único ou principal reservatório e fonte de infeção do vetor) [2].

Das 30 espécies de *Leishmania* conhecidas no mundo, cerca de 20 podem infectar o homem. Destas espécies, a maioria é considerada zoonótica enquanto a minoria é antroponótica [3].

Está provado que cerca de 98 espécies de flebótomos existentes são vetores de leishmaniose humana (42 espécies são de *Phlebotomus* e as restantes 56 espécies são de *Lutzomyia*) [4].

A leishmaniose pode assumir três formas distintas nos humanos, de acordo com as manifestações clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose mucocutânea. Estima-se que por ano surjam entre um e um milhão e meio de novos casos de leishmaniose cutânea e cerca de 500 mil novos casos de leishmaniose visceral [3].

Algumas espécies podem originar mais do que uma forma clínica, mas as consideradas mais importantes no caso da leishmaniose visceral (*Kala-azar*) são a *Leishmania donovani* e a *Leishmania infantum*, por oposição à leishmaniose cutânea que quase todas as espécies podem causar [5].

A *L. donovani* é encontrada principalmente em África, Índia, Bangladesh e Nepal, e estima-se que a sua transmissão seja maioritariamente antroponótica. Por oposição, a transmissão de *L. infantum* é considerada zoonótica (de reservatórios caninos para o homem) na região Mediterrânica, Médio Oriente, Ásia central, China e América Latina.

A LV é considerada uma doença progressiva e sintomática, que se não for tratada é geralmente fatal, com uma taxa de mortalidade entre 75 e 95% dos casos. Esta tem uma duração média de dois anos, embora possa ocorrer uma cura espontânea [5]. No fim da década de 80, esta doença afetava maioritariamente crianças, mas atualmente a maioria de casos surge em adultos imunodeprimidos. Hoje em dia também se sabe que a Leishmaniose visceral é a responsável pela maioria das fatalidades causadas pela doença [5].

Em Portugal, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa, entre 2005 e 2014, foram detetados cerca de 119 novos casos de LV (provocada por *L. infantum*), dos quais 17 corresponderam a adultos saudáveis, 36 a crianças e 66 a doentes imunodeprimidos. Durante este período, também foram diagnosticados 16 casos de LC [6].

O diagnóstico é feito geralmente através dos sintomas, e pela observação de esfregaços ao microscópio. Uma vez que os esfregaços sanguíneos são considerados pouco fiáveis (devido à presença reduzida de parasitas circulantes no sangue), são feitos esfregaços utilizando material proveniente de biópsias de órgãos abdominais, de pele e de aspirados de medula óssea. Existem outros métodos de diagnóstico, tal como a serologia (Imunofluorescência Indireta, *ELISA* e *Western Blot*), mas os mesmos não possuem condições para serem adaptados ao campo. O PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é considerado mais sensível que a observação ao microscópio, mas requer acesso a hospitais e centros clínicos desenvolvidos que possuam material adequado para a sua realização.



A terapêutica e prognóstico dependem das condições sócio-económicas, bem como da área geográfica em que se encontram, sendo que a maioria de pessoas que possuem LV não apresentam bons resultados por esta ser uma doença associada à pobreza das populações.

A prevenção passa pelo controlo dos vetores, uma vez que não existe uma vacina eficaz capaz de permitir uma imunização adequada, não só pela complexidade da resposta imune mas também pelos efeitos imunomodulatórios dos antígenos da saliva dos flebótomos [5].

### **1.1.2 Leishmaniose canina**

A leishmaniose canina (Lcan) faz parte das doenças caninas transmitidas por vetores (CVBD – *canine vector borne diseases*), as quais são provocadas por uma grande variedade de agentes patogénicos (principalmente bactérias e parasitas) e são transmitidas aos cães por vários vetores artrópodes (particularmente insetos e carraças) [7].

A Lcan causada por *L. infantum*, constitui uma doença zoonótica muito importante em vários países e áreas geográficas incluindo: Portugal, Espanha, Sul de França, Itália, Grécia, Turquia, Israel, Egipto, Tunísia, Argélia, Marrocos, Iraque, Irão, Paquistão e partes da China, entre outros.

Estudos de seroprevalência realizados em Portugal, Espanha, França e Itália, estimam que nessas áreas geográficas, cerca de dois milhões e meio de cães (numa população de 15 milhões) estão infetados com *L. infantum* e que é possível uma propagação para o Norte da Europa [3]. Em Portugal estão reconhecidos três focos zoonóticos desde os anos 80: Região de Lisboa, Região de Trás-os-Montes e Alto Douro, e Região do Algarve [8].

Em alguns países onde não ocorre a transmissão por parte de flebótomos (tal como a Holanda, Reino Unido e Suécia), foram relatados alguns casos de leishmaniose canina provocados pela importação ou transporte de animais infetados de outros países endémicos [3]. Também um estudo realizado na Alemanha, permitiu concluir que surgiram novos casos de leishmaniose em regiões anteriormente indemnes, devido às condições climáticas que se tornaram favoráveis para o desenvolvimento do vetor [9].

Estimam-se que as taxas de infeção canina (utilizando PCR como meio de diagnóstico) em focos altamente endémicos rondam os 70-90%. Destes, apenas uma pequena proporção de cães sucumbe à infeção, enquanto a maioria são resistentes e se tornam doentes subclínicos.

Como muitos dos animais presentes em áreas endémicas suportam infeções subclínicas, são utilizados diversos métodos de diagnóstico que incluem não só a observação de sinais clínicos compatíveis com a doença, bem como a realização de serologia e demonstração da presença do parasita nos tecidos através de PCR [3].

Um estudo realizado em Barcelona concluiu que a idade constitui um dos fatores de risco para a doença, tendo esta dois picos de suscetibilidade: um em cães jovens (dois a

quatro anos) e outro em cães mais velhos (mais de sete anos). Esta distribuição de idades pode se justificar pelo facto de ter um curso crónico, o que permite que animais que foram infectados quando eram jovens, apresentem sinais clínicos mais tardiamente por razões variadas (imunodepressão, doenças concomitantes, etc.).

Além da idade, também se estima que a raça poderá ser um fator de risco, sendo que o *Boxer*, o *Cocker spaniel*, o *Rottweiler* e o Pastor Alemão são aparentemente mais suscetíveis. Verificou-se também que as raças menos suscetíveis são o *Yorkshire Terrier* e o Caniche, talvez por serem consideradas raças que vivem mais frequentemente num ambiente de interior e portanto estão menos expostas a vetores [10]. Também se sabe que algumas raças que evoluem em áreas endêmicas, raramente desenvolvem doença e apresentam uma proteção imunitária predominante [3].

O sexo também pode representar um fator condicionante, uma vez que Miranda *et al.* sugeriram que os machos têm maior suscetibilidade para desenvolver doença do que as fêmeas [10].

Além do sexo, Morillas *et al.* concluíram que o comprimento da pelagem permite ao vetor se alimentar mais facilmente e conseqüentemente facilita a infecção do hospedeiro, verificando-se um nível mais alto de seroprevalência em cães de pêlo curto (37,6%) em contraste com cães de pêlo longo (20,9%) [11].

#### **1.1.2.1. Etiologia**

##### **1.1.2.1.1 Transmissão e Vetor Invertebrado**

O vetor invertebrado (*sand fly*) é um flebótomo cuja classificação se insere na Ordem *Diptera*, Família *Psychodidae*, Pseudofamília *Phlebotominae*, e pode pertencer a 13 gêneros diferentes (sendo os gêneros *Phlebotomus spp.* e *Lutzomyia spp.* os que possuem maior importância em medicina veterinária).

Uma classificação taxonômica universal ainda não foi aceite, mas a mais recente reconhece mais de 800 espécies de flebótomos (com 464 no novo mundo e 375 no velho mundo) [4].

Tal como referido anteriormente, está provado que cerca de 98 espécies existentes são vetores de leishmaniose humana (42 espécies são de *Phlebotomus* e as restantes 56 espécies são de *Lutzomyia*) [4].

A distribuição dos vetores é muito variada, compreendendo várias regiões: Ásia, África, Austrália, Sul da Europa e América.

No Velho Mundo presume-se que exista um total de 42 espécies, 20 das quais são responsáveis pela transmissão de *Leishmania infantum*, e as restantes são responsáveis pela transmissão de espécies como *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*.

No novo mundo estão presentes cerca de 56 espécies (todas de *Lutzomyia*), as quais estão envolvidas na transmissão de 15 espécies de *Leishmania*, nomeadamente: *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, entre outras [4].

Em Portugal, conhecem-se atualmente 5 espécies distintas de flebótomos: *Phlebotomus ariasi*, *P. perniciosus*, *P. sergenti*, *P. papatasi* e *Sergentomyia minuta*. Destas, as que existem na região do Algarve são: *P. perniciosus* (90,5% das espécies estudadas), *S. minuta* (6,33%), *P. sergenti* (2,11%), *P. ariasi* (0,84%) e *P. papatasi* (0,21%) [12]. Outro estudo realizado na região de Trás-os-Montes e Alto Douro permitiu concluir que as espécies mais frequentes nesta zona são *P. ariasi*, *P. perniciosus* e *S. minuta*. Destas enunciadas, *P. ariasi* é a que prevalece (com cerca de 73,1% das espécies estudadas), por oposição a *P. perniciosus* (19,0%) e *S. minuta* (7,9%) [6]. Está provado que *P. perniciosus* e *P. ariasi* são os vetores para *L. infantum*, e que a sua actividade tem início em Maio/Junho e termina em Outubro/Novembro, quando as temperaturas diminuem até aos 12°C ou menos [8].

Os flebótomos são pequenos insetos com um comprimento corporal compreendido entre 2 e 3mm, de cor acastanhada ou cinzenta e revestidos de sedas.

Nas regiões mediterrânicas e asiáticas, estes são mais ativos durante os meses mais quentes (desde a primavera até ao outono), em oposição ao que acontece na América latina onde algumas espécies são ativas durante todo o ano. Não percorrem grandes distâncias (por serem maus voadores), e estudos demonstram que se dispersam pouco mais de um km em relação aos seus locais de criação (detritos de folhas, ninhos de roedores, cantos de casas, rochas, orifícios nas árvores e entre vegetação densa), onde realizam a ovopostura [3, 13].

Como o comportamento das fêmeas é distinto, por serem hematófagas (em oposição aos machos que se alimentam de sucos vegetais) e terem maior atividade crepuscular e noturna, estas apresentam algumas diferenças morfológicas. Ambos possuem: uma cabeça com um par de olhos, um par de antenas cujo flagelo apresenta 14 artigos, um par de palpos com cinco artigos e um aparelho bucal picador-sugador (o qual possui sete peças nas fêmeas); um tórax com aspeto giboso onde se insere um par de asas lanceoladas com segunda e quarta nervuras longitudinais bifurcadas e três pares de patas, sendo as posteriores mais longas; um abdómen com dez segmentos subiguais com evidente dimorfismo sexual (tendo no macho os últimos segmentos posteriores forma de garra) [14].

O seu ciclo de vida é composto por quatro estádios de desenvolvimento (ovo, larva, pupa e adulto – Figura 1), mas ao contrário de outros insetos, os estádios imaturos não requerem água corrente para completar o seu desenvolvimento, apenas alguma humidade e calor (temperaturas entre 25 e 28°C). Após a alimentação, a fêmea deposita os ovos num ambiente favorável, os quais eclodem consoante a temperatura, emergindo as primeiras larvas entre os 12-19 dias, pupas entre os 25-59 dias e adultos entre os 35-69 dias [4].

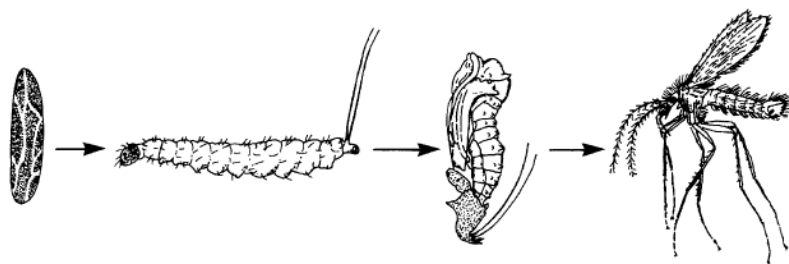


Figura 1 – Estádios de desenvolvimento dos Flebótomos. Adaptado de [13]

#### 1.1.2.1.1.1 Outros vetores

Apesar dos flebótomos serem os únicos vetores comprovados de *Leishmania spp.*, foram colocadas várias hipóteses de existência de outros. Dessas possibilidades destacam-se as carraças e pulgas, uma vez que em locais não endêmicos pode existir uma baixa percentagem de flebótomos infetados, ou existir uma transmissão autóctone sem que haja presença dos mesmos nessa zona [15]. Além de poderem transmitir outros agentes infecciosos (bactérias, protozoários, nematodes e vírus), estes artrópodes (carraças e pulgas) possuem algumas características que os tornam bons candidatos a vetores: necessitam de realizar refeições sanguíneas num hospedeiro para mudarem de estágio larvar, têm boa resistência ao ambiente e possuem elevada densidade populacional.

Um estudo realizado por Ferreira *et al.*, permitiu verificar a presença de ADN de *Leishmania spp.* em pulgas recolhidas de cães infetados, e após inoculação dessas pulgas em hamsters, observou-se uma positividade de 45% para o ADN de *Leishmania spp.* no baço dos mesmos. Apesar de se terem verificado resultados positivos, não se pode concluir com certeza que as pulgas representam um vetor de Leishmaniose, pois não é clara a forma como os cães foram infetados (os quais poderiam ter sido infetados por flebótomos antes da recolha das pulgas) [16].

Estudos anteriores demonstraram a presença de ADN de *Leishmania spp.* em carraças, que foram recolhidas de cães com leishmaniose. Um desses estudos conduzido por Solano-Gallego *et al.*, demonstrou que em 128 exemplares de *Rhipicephalus*, cerca de 10,1% possuíam ADN de *Leishmania spp.*, e também que a maioria dos positivos eram machos retirados de cães seronegativos no diagnóstico de Lcan [17].

Salvatore *et al.* conduziram um estudo em Itália, numa área geográfica endémica onde o vetor não era considerado evidente, e analisaram a possível presença de ADN de *Leishmania spp.* nas 119 carraças recolhidas a várias espécies (homens, cães e gatos). Neste, verificaram a presença de ADN de *Leishmania spp.* em 7,5% das carraças removidas [18]. Está portanto sugerida a transmissão através de artrópodes hematófagos (nomeadamente carraças), mas não está provado que estes possuam uma capacidade vetorial.

Outros estudos, comprovam a transmissão transovárica e entre estádios de *R. sanguineus*. Após a inoculação de fêmeas com segmentos de ADN de *Leishmania spp.*,

observaram uma persistência de infecção nos seus ovos e larvas, através da realização de testes de PCR em tempo real [19].

Outro estudo levado a cabo por Torres *et al.*, também permitiu detectar KADN de *L.infantum* nas glândulas salivares de carraças recolhidas num cão naturalmente infetado. No entanto, apesar de ser sugestivo, não pode ser considerado como prova irrefutável para designar as carraças como vetores de leishmaniose, e portanto é necessária a realização de mais estudos [20].

#### **1.1.2.1.1.2 Outros tipos de transmissão**

O tipo de transmissão mais mencionado é através da picada dos flebótomos, mas existem outras formas de transmissão. Vários estudos em regiões onde não se encontram provas da existência de vetores, comprovam que também é possível uma transmissão vertical (de uma cadela gestante para a sua ninhada) ou uma transmissão venérea (entre machos e cadelas infetados) [3].

Silva *et al.*, conduziram um estudo no qual concluíram que existe transmissão venérea de Lcan (provocada por *L. chagasi*) e que o parasita tem tropismo para o sistema reprodutor masculino, onde provoca lesões e promove a libertação de *Leishmania spp.* no sémen. Também sugeriram que a infecção ocorre de forma unidirecional, de machos para fêmeas, uma vez que no sistema reprodutor feminino das cadelas do estudo não registaram quaisquer alterações [21]. Por sua vez, Naucke & S. Lorentz concluíram que na Alemanha, uma cadela infectou uma cria de uma das suas ninhadas por transmissão vertical e transplacentária [15].

Além destas, também está provado ser possível a transmissão através de transfusões sanguíneas de cães infetados, o que acrescenta uma preocupação especial nas áreas em que os dadores são doentes subclínicos [22].

Tal como referido anteriormente, pensa-se também que será possível perpetuar a infecção através de pulgas ou de contato direto entre cães, em especial nas zonas onde não existem aparentemente vetores, mas tal ainda não está totalmente esclarecido [3].

#### **1.1.2.1.2 Hospedeiros vertebrados**

O cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é considerado o principal hospedeiro reservatório para a Leishmaniose humana na Bacia Mediterrânica, Médio Oriente e América do Sul (onde *L. infantum* constitui o principal agente de infecção).

Em comparação com outras espécies, a *L. infantum* apresenta uma variabilidade genética baixa, o que permite concluir que esta foi introduzida no Novo Mundo através da importação de cães infetados [3].

Considera-se o cão como um bom hospedeiro reservatório de *Leishmania spp.*, pois este: possui a capacidade de ficar infetado e de permitir que a infecção se transmita; tem um tempo de vida relativamente longo (favorecendo o tempo de exposição e transmissão);

encontra-se frequentemente em contato com flebótomos; e o seu habitat é o mesmo que o do homem [23].

Além do cão, também foram registados vários casos de infecção por *L. infantum* em alguns gatos domésticos, cavalos, porcos e roedores, na Europa e na América do Sul [3]. Um desses estudos demonstrou a presença de ADN de *Leishmania spp.* (em vários tipos de roedores) e do zimodeme IOC/Z74 (tanto em humanos como em roedores), sugerindo a implicação dos mesmos nos ciclos domésticos e silváticos de transmissão do parasita [24].

Poli *et al.* demonstraram através da realização de exame físico, esfregaços citológicos e cortes histológicos, que os gatos domésticos também podem ficar infetados e exibir doença clínica [25]. Também Martín-Sánchez *et al.* estudaram a doença clínica em gatos domésticos, e concluíram que a infecção provocada por *L. infantum* assume a forma de lesões cutâneas com disseminação visceral, enquanto as formas cutâneas se restringem a outras espécies de *Leishmania*. Além disso, sugeriram que a presença concomitante de alguns vírus imunossupressivos (FIV ou FeIV) num gato infetado por *Leishmania*, pode favorecer a replicação do parasita e consequentemente as manifestações dos sinais clínicos [26].

Vários estudos foram realizados em canídeos selvagens de diversos países, (nomeadamente a raposas, lobos, linçes, genetas, mangustos e texugos), e permitiram concluir que *L. infantum* também se encontrava nestas espécies. Destes destacam-se as raposas, que em Portugal foram reportadas com seroprevalências entre 18 e 60%, cerca de 18% em Itália e 2,7% em Espanha. No entanto, quando recorreram a análise por PCR, 74% dos casos foram positivos em Espanha [27]. Além das raposas, também foram detectados no Irão, dois casos positivos num lobo e num chacal [28].

Zhang *et al.* demonstraram a presença de ADN de *Leishmania spp.* em seis espécies diferentes de lagartos do deserto num foco endémico do noroeste da China, com uma prevalência de 64,6%. Além destes, também identificaram prevalências de 30,4% em ovelhas e 21,6% em burros [29].

Em Espanha, devido à sua elevada densidade populacional, proximidade com a periferia das cidades e casos de Leishmaniose humana, surgiu a necessidade de estudar as lebres silvestres. Deste estudo, através da utilização de xenodiagnóstico, concluiu-se que lebres aparentemente saudáveis possuíam a capacidade de infetar em média 4,7% dos flebótomos [30].

Apesar de estas terem sido consideradas espécies que podem ser infetadas, não está provado que todas possam contribuir para a transmissão do parasita. No entanto, a sua importância não deve ser desconsiderada, pois estas podem servir como reservatórios primários ou secundários, participando em ciclos silváticos ou peridomésticos.

#### 1.1.2.1.3 Parasita *Leishmania spp.*

A Leishmaniose é perpetuada por protozoários do Reino Protista, Filo *Sarcomastigophora*, Classe *Kinetoplasta*, Ordem *Kinetoplastida*, Família *Trypanosomatidae* e do género *Leishmania*. O género *Leishmania* encontra-se dividido nos subgéneros *Leishmania* e *Viannia*, e essa divisão baseia-se na diferença do local de desenvolvimento do parasita no vetor [3].

O subgénero *Leishmania* constitui cerca de 30 espécies, incluindo: *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*, o complexo *L. donovani* (que inclui *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*) e o complexo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*). Por sua vez, o subgénero *Viannia* é constituído por 4 espécies relevantes: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*. Enquanto uns se replicam no intestino posterior (*Leishmania braziliensis*), outros replicam-se no intestino médio (outras espécies de *Leishmania*) dos flebótomos.

A classificação das diferentes espécies de *Leishmania* pode-se realizar de vários modos, tais como: uso de anticorpos monoclonais, padrões de isoenzimas por eletroforese, análise e comparação de segmentos de ADN e análise de antígenos de superfície [3]. Destes, o método considerado *gold standard* para tipificação de *Leishmania spp.* é a interpretação de padrões de dispersão de isoenzimas por eletroforese, e o mais usado é o sistema Montpellier (MON), o qual se baseia na análise de 15 enzimas.

Existem atualmente 31 zimodemes conhecidos associados a *L. infantum*, sendo o MON-1 o mais reconhecido (presente em infeções humanas e caninas). Este ocorre em mais de 30 países e representa cerca de 70% de todos os conhecidos.

Sabe-se que em Portugal, MON-1 representa cerca de 96,7% dos zimodemes existentes [31]. Além desse, foi reconhecido também o zimodeme MON-98 de *L. infantum* em cães, o MON-24 num humano com VIH e num flebótomo (*P. ariasi*), e o MON-18 (de *L. donovani*) em outro humano com VIH [32]. Outro estudo feito no país, permitiu o isolamento de MON-80, que é considerado incomum e responsável pela transmissão de LV ou LC, de um humano com VIH [33].

Permanecem no entanto alguns obstáculos a este método de classificação, pois é necessário cultivar o parasita e podem ainda existir modificações no genoma do mesmo que impedem a mobilidade enzimática na eletroforese. Deve-se portanto complementar este método com outros tais como o PCR, que utiliza alvos de ADN polimórfico com alto poder discriminatório [34].

Os parasitas do género *Leishmania* são dimórficos e heteróxicos, apresentam duas formas parasitárias (amastigota e promastigota) e necessitam de dois hospedeiros (um vertebrado e um invertebrado) para concluir o seu ciclo parasitário. A forma amastigota possui uma forma arredondada ou oval com cerca de dois a quatro µm de diâmetro, e encontra-se no sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado, nomeadamente dentro dos fagolisossomas dos macrófagos, como se observa na Figura 2 [35]. Por sua vez, a forma

promastigota é mais estreita e longa (15 a 30  $\mu\text{m}$ ), possui aspecto fusiforme com um flagelo comprido na porção anterior, é extracelular e bastante móvel, principalmente se for metacíclica. Esta localiza-se desde o intestino médio até à porção anterior do intestino do vetor (hospedeiro invertebrado) [3].



Figura 2 – Formas amastigotas de *Leishmania spp.* (seta vermelha), em citologia de pele de um cão. Coloração *Diff-Quick*. Ampliação 1000x. Fotografia gentilmente cedida por laboratório veterinário INNO.

#### 1.1.2.2 Ciclo de vida

No interior do vetor (flebótomo), o parasita desenvolve-se no aparelho digestivo, sendo que a maioria das espécies de *Leishmania* têm desenvolvimento suprapilórico (no estômago). Por sua vez, outras (p. ex.: do subgênero *Viannia*) são peripilóricas e penetram no intestino posterior antes de migrarem para o estômago [36, 37].

O vetor (fêmea) fica infetado quando ingere uma refeição de sangue contendo macrófagos parasitados com formas amastigotas, as quais se deslocam para a região posterior do estômago. Nesse local, as formas amastigotas diferenciam-se e deslocam-se para a válvula estemodeal (região que faz a conexão à região anterior do aparelho digestivo).

Nas 24–48h seguintes, as formas amastigotas diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas que possuem um pequeno flagelo e multiplicam-se. Estas estão protegidas do epitélio gástrico pela membrana peritrófica, sendo por isso resistentes a enzimas digestivas.

Entre as 48–72 horas seguintes, as formas procíclicas diferenciam-se em nectomonas (de aparência delgada e comprida) que migram para a região anterior do estômago (pela membrana peritrófica) e ligam-se a células epiteliais gástricas.

Após quatro dias surgem as formas leptomonas (que se multiplicam), e após cinco-sete dias observam-se as formas haptomonas (com flagelo curto e imóveis que se acumulam no local) e metacíclicas (formas infetantes, rápidas) na válvula estemodeal [38].



A válvula estomodeal sofre alterações provocadas pela acumulação de formas haptomonas (que bloqueiam a via alimentar e alteram as bombas faríngea e cibarial), o que faz com que o vetor efetue esforços adicionais para ingerir uma refeição de sangue. Isto, faz com que as formas metacíclicas promastigotas (infetantes) sejam injetadas no local onde o flebótomo faz a picada para se alimentar. Em seguida, as promastigotas ligam-se aos fagócitos mononucleares do hospedeiro (animal que recebeu a picada do flebótomo e que constitui a sua fonte de sangue), via um mecanismo recetor mediado e são posteriormente fagocitadas (fundindo-se com os lisossomas e formando um fagolisossoma). Uma vez dentro do macrófago, o parasita sofre alterações metabólicas e bioquímicas, transformando-se na forma amastigota [39]. Estas por sua vez, multiplicam-se por divisão binária, aumentam o volume da célula hospedeira até à sua rutura, e permitem que as amastigotas infetem outras células mononucleares fagocíticas. As formas parasitárias circulantes no sangue possibilitam que um flebótomo faça a sua refeição e fique desta forma infetado, perpetuando de novo o ciclo.

Esta resposta inflamatória do hospedeiro vertebrado é desencadeada pela lesão provocada pelas peças bucais do vetor quando se alimenta, a qual reúne células inflamatórias (macrófagos, células dendríticas e de Langerhans), permitindo a instauração da infeção [4]. O ciclo de vida de *Leishmania spp.* pode ser observado na Figura 3.

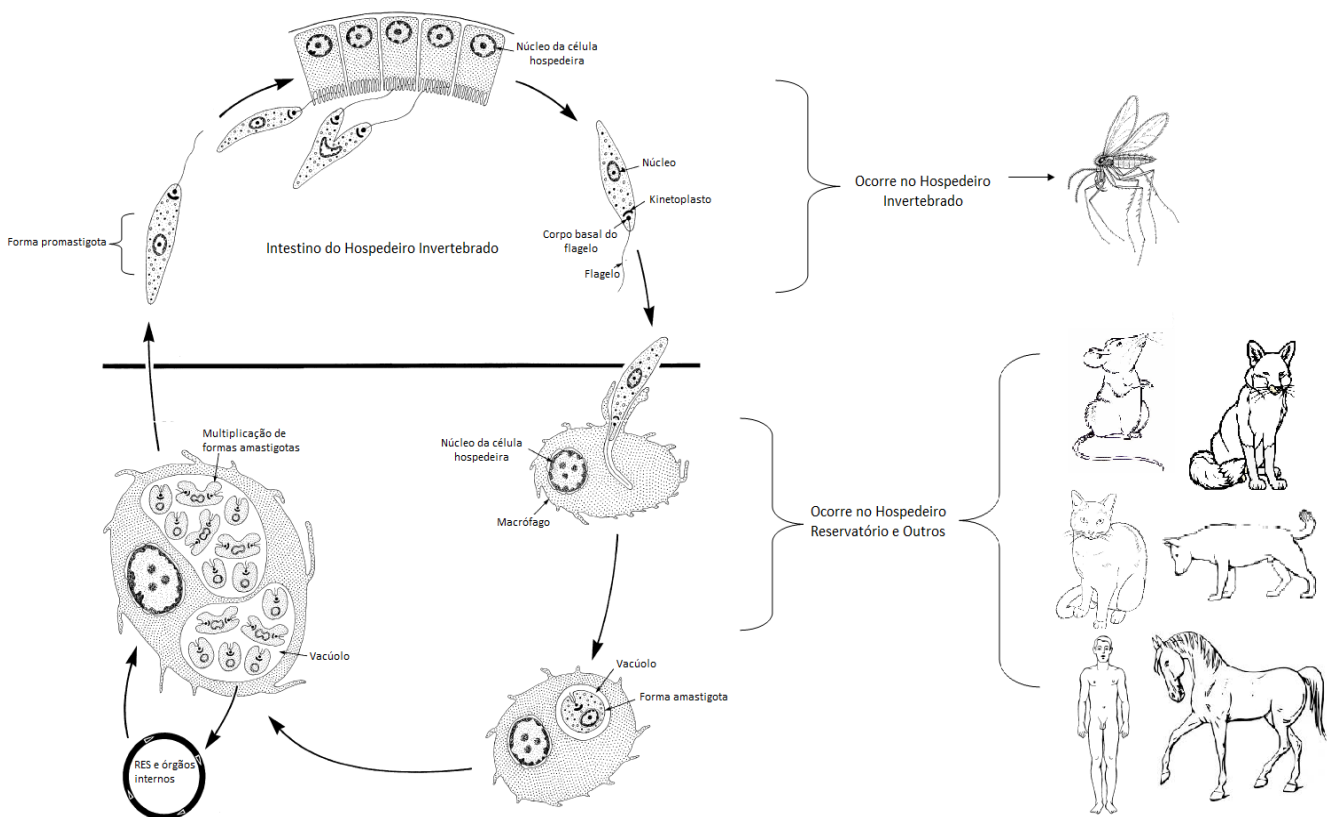


Figura 3 – Esquema representativo do ciclo de vida de *Leishmania spp.*

### **1.1.2.3 Patogénese e Resposta imunitária**

A patogenia pode ser condicionada por diferentes fatores: os que dizem respeito ao hospedeiro e os que são relacionados com o parasita.

Os fatores relativos ao hospedeiro são considerados os principais, pois são estes que condicionam o desenvolvimento da doença clínica ou a capacidade de resistência, através da genética e da resposta imunitária.

Os fatores relacionados com o parasita variam consoante o zimodeme correspondente, o qual determina a virulência e consequentemente a resposta do hospedeiro.

Existem ainda outros fatores que podem ser condicionantes, tais como o estado sanitário ou nutricional do hospedeiro, afetando não só os cães mas também os humanos [40].

Tal como referido anteriormente, pensa-se que a expressão genética possa estar envolvida na suscetibilidade ou resistência à infeção por *Leishmania spp.*. Desta forma, Sanchez-Robert *et al.* realizaram um estudo em 97 cães (40 naturalmente infetados e 57 saudáveis), de 14 raças diferentes, para testar a implicância do gene *S1c11a1* na suscetibilidade à Leishmaniose canina. Este consiste num protão/catião bivalente que é denominado comumente por *Nramp1*, o qual está associado à regulação da resistência e suscetibilidade a *Salmonella*, *Leishmania* e *Mycobacterium* em ratos através dos macrófagos. Além disso, também está associado à regulação de citocinas/quimiocinas (tais como o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 10) e à indução da síntese de óxido nítrico. Também está provada a sua ação na suscetibilidade associada a doenças infecciosas e autoimunes em humanos. Desta forma, geraram-se 14 haplótipos, que diferiram nos dois grupos de estudo (cães infetados e saudáveis), devido às diferenças encontradas nos nucleótidos do genoma. Destes, os mais repetidos foram o TAG-8-141 (em todas as raças, com uma frequência de 0,35) e o TAG-9-145 (principalmente na raça *Boxer*, com uma frequência de 0,32), sugerindo neste último a existência de uma distribuição haplóide específica da raça. Observou-se o haplótipo TAG-9-145 maioritariamente em indivíduos homozigóticos da raça *Boxer* do grupo controlo, enquanto que TAG-8-141 foi associado ao grupo de animais infetados, onde cerca de 50% dos *Boxer* foram identificados como heterozigóticos. Estes resultados sugeriram que cães de raça *Boxer* que possuem o alelo TAG-8-141 são mais suscetíveis à infeção, enquanto o alelo TAG-9-145 poderá ser protetor no caso de indivíduos homozigóticos [41].

No hospedeiro, as formas parasitárias possuem capacidade de ficar ocultas da resposta imune e para tal utilizam diversas células. Dessas células destacam-se as mielóides (tais como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos), as quais abrigam este parasita intracelular. Apesar dos macrófagos terem lugar de destaque na sobrevivência e eliminação do parasita, vários estudos referem os neutrófilos como células também importantes na patogenia da Lcan. Estes últimos, possuem capacidade de eliminar um vasto espetro de patogéneos e são conhecidos como “fagócitos tradicionais”, que constituem a primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos ou substâncias estranhas (sendo uma das primeiras células hospedeiras de parasitas de *Leishmania spp.*). Foi demonstrado que o fator quimiotático

de *Leishmania spp.* recruta neutrófilos para o local de infecção, e ao interagir com o recetor de lipoxina A4 resulta num tropismo de parasitas para o local e aumento da sobrevivência intrafagocitária. Além disso, a saliva dos vetores possui fatores anti-agregação e anticoagulantes que podem potenciar o influxo de células ao local [1, 42].

Algumas teorias referem que os neutrófilos podem atuar como “cavalos de tróia”, pois estes podem ser controlados pelos parasitas de três formas: o recetor da lipoxina (ALX) reage com lípidos anti-inflamatórios (como a lipoxina A4), aumentando a fagocitose de células em apoptose; de outra forma, o inóculo virulento inclui promastigotas positivas a fosfatidilserina, a qual induz a produção de TGF- $\beta$ , e como as células em apoptose não representam perigo, não ocorre a ativação das funções antimicrobianas efectoras dos fagócitos; a última forma é tirar partido da tendência dos neutrófilos morrerem por apoptose e simultaneamente recrutarem macrófagos, fazendo com que os parasitas escapem dos neutrófilos imediatamente antes de infetarem os macrófagos onde se podem multiplicar [42].

Os parasitas possuem uma capacidade de sobreviver intracelularmente, resistindo a enzimas dos fagossomas dos macrófagos, através de umas moléculas chamadas de “fatores de virulência do parasita”. Destas moléculas, destacam-se o lipofosfoglicano e a proteína de superfície GP63. Esta capacidade de sobrevivência é a que permite ao parasita libertar-se do interior do macrófago e disseminar-se para os outros órgãos.

Quando as formas promastigotas são fagocitadas e se diferenciam em formas amastigotas (no fagossoma), sofrem tentativas de destruição por parte dos macrófagos, tais como: respiração oxidativa, acidificação e digestão. Na primeira, a fagocitose ativa uma oxidase na membrana plasmática, a qual transfere protões para o oxigénio molecular e promove a formação de radicais que reagem no local. Na segunda, após a fusão do fagossoma com o endossoma, sucede-se uma acidificação (descida de pH) da vesícula parasitária pela ação do protão ATPase, que por sua vez promove a desnaturação das proteínas, tornando-as suscetíveis em relação às hidrolases ácidas. No processo de digestão, após a fusão de lisossomas com o endossoma, libertam-se as hidrolases ácidas que degradam o ADN, ARN, proteínas e hidratos de carbono [1, 43]. Estes mecanismos diferem entre espécies de *Leishmania*, o que explica o polimorfismo entre a Leishmaniose humana e canina.

Além da capacidade de resistência dos parasitas, a saliva que os vetores flebótomos injetam na pele do hospedeiro durante a picada, possui componentes que podem ter potencial farmacológico (vasodilatadores, anti-coagulantes, anestésicos locais) e propriedades imunomodulatórias (que potenciam a eficácia da infecção).

Cada animal infetado possui uma resposta imunitária única, a qual determina o curso que a doença toma. Os parasitas podem ser eliminados localmente (infecção auto-limitante), podem ficar sequestrados na pele e linfonodos (não se disseminando e causando infecção assintomática) ou podem-se disseminar por todo o corpo (levando ou não ao aparecimento de sinais clínicos e/ou alterações clinico patológicas) [43].

Portanto, em animais resistentes, os parasitas não possuem capacidade de se disseminar além do linfonodo eferente. Por sua vez, nos animais suscetíveis ocorre multiplicação dos parasitas, ruptura dos macrófagos infectados e dispersão para diferentes órgãos (medula óssea, linfonodos, pele, baço, fígado e rins), onde ocorrem posteriormente reações inflamatórias granulomatosas e mecanismos imuno-mediados (deposição de complexos imunes).

Está provado que cães autóctones ou cães sem raça definida que nascem em áreas endêmicas são mais resistentes, pois conseguem produzir uma resposta imunitária mais protetora [43].

Após a picada do vetor e da inoculação do parasita na pele do cão, sucede-se (após algumas horas) a infiltração de macrófagos localmente. Seguidamente, a ação de citocinas com efeitos quimiotáticos (como por exemplo, a proteína quimiotática para monócitos – 1, MCP-1) dá início à fagocitose e à endocitose do parasita. Esta última, é resultado do reconhecimento da glicoproteína GP63 (que se encontra na membrana celular do parasita) por parte de um recetor da membrana do macrófago juntamente com as células dendríticas (que possuem papéis muito importantes na modulação e regulação da resposta imunitária específica anti-*Leishmania*). Após a infeção dos macrófagos, estes auxiliam no transporte dos parasitas da pele para o linfonodo aferente (e estimulam células T protetoras de memória) utilizando proteínas do complexo MHC-II [43].

Os linfócitos T e as suas subpopulações possuem papéis muito importantes na resposta imune, e por isso alguns estudos sugerem que o número de linfócitos T-helper (Th) CD4+ no sangue periférico de cães suscetíveis está reduzido e inversamente correlacionado com a severidade da doença. Deste modo, põe-se a hipótese de que a imunidade celular mediada comprometida pode estar relacionada com um defeito em células Th. Outros estudos sugerem que células Th CD8+ são essenciais para a proteção do hospedeiro, devido à sua capacidade de provocar lise de macrófagos infectados utilizando MHC-II (e talvez MHC-I de forma restrita). Estas são por isso associadas à resistência e baixa carga parasitária [44].

Apesar de existir uma associação clara entre a ativação de Th1 e resistência, e entre a ativação de Th2 e suscetibilidade (a qual foi provada em laboratório, em infeções animais provocadas por *Leishmania spp.* dermatrópicas), o papel de Th1 e Th2 ainda é considerado confuso. Após revisão dos perfis de citocinas, pensa-se que tanto Th2 como Th1 estão presentes, mas este último pode estar associado a cães resistentes. [43]

De entre as citocinas de Th1, a interleucina-2 (IL-2) e o INF- $\gamma$  (Interferão *gamma*) foram correlacionados com resistência. A IL-2 aumenta a produção de INF- $\gamma$  e protege o organismo da doença, atrasando a expressão de sinais clínicos [45]. Um estudo feito por Solano-Gallego *et al.*, permitiu concluir que cães infectados que tenham falta de produção de IFN- $\gamma$ , produzem uma resposta humoral forte, uma parasitemia elevada e exibem doença clínica severa [46].

De entre as citocinas do tipo Th2, a IL-4 foi relacionada com a suscetibilidade à Lcan. Ao contrário do que sucede na LV, a IL-10 não parece contribuir para a suscetibilidade ou

acumulação nos tecidos de cães com leishmaniose [45]. O papel da IL-13, cujo mRNA foi detectado na pele mas não na medula óssea de alguns cães, não está completamente esclarecido. Também o Factor de transformação do crescimento Beta (TGF- $\beta$ ), que é outro produto de Th2, tem uma grande capacidade supressora e modeladora do sistema imunitário. Este suprime o desenvolvimento de Th1 e Th2, inibe a síntese de IFN- $\gamma$  e NOS2 e consequentemente diminui a capacidade que os macrófagos têm de eliminar parasitas [47]. Desta forma pode-se concluir que o papel das citocinas bem como os seus perfis associados à resistência ou suscetibilidade ainda não estão corretamente estabelecidos.

Os cães resistentes produzem anticorpos de vários tipos mas numa frequência e concentrações mais reduzidas que os cães suscetíveis, o que permite inferir que a produção de anticorpos específicos está diretamente relacionada com a carga parasitária e severidade de sinais clínicos. De todos os tipos de anticorpos, o que predominam são os IgG [46]. Um estudo realizado em ratos, demonstrou que as subclasses de IgG estão associadas com a resposta e resistência de Th1 (IgG2a) ou com resposta e suscetibilidade de Th2 (IgG1) a espécies dermatóricas de *Leishmania*.

Cães suscetíveis produzem anticorpos contra uma vasta lista de antígenos de parasitas, tais como: K39, proteínas de choque de calor (HSP-70), histonas, proteases cisteínicas, proteínas gp63 e gp70, entre outros. O papel patogénico destes ainda não está comprovado, mas pensa-se que a seropositividade ao antígeno K39 e à proteína GP63 está ligada ao aparecimento de sinais clínicos.

Outros componentes como as crioglobulinas e os autoanticorpos contra células sanguíneas, músculos e componentes nucleares, são produzidos e a sua acumulação pode contribuir para várias manifestações clínicas de Lcan. Por sua vez, a ativação prejudicial de células B e a superprodução de imunoglobulinas é exemplificada pela produção de complexos imunes compostos por IgG, IgM e/ou IgA. Estes, não só reduzem a atividade fagocítica dos macrófagos, como também agravam a inflamação via ativação do complemento, tendo um papel importante em diversos tecidos e órgãos [1, 43].

#### **1.1.2.3.1 Alterações Patológicas**

Tal como referido anteriormente, diferentes tecidos e órgãos do corpo podem ficar afetados com inflamação granulomatosa e/ou mecanismos imuno-mediados.

A inflamação granulomatosa caracteriza-se por infiltração e/ou proliferação de células (macrófagos, histiócitos, linfócitos, células plasmáticas e por vezes neutrófilos e eosinófilos), e parece ser especialmente importante nos linfonodos, medula óssea, baço, fígado, intestino, osso, sistema reprodutor masculino e mucosas. Por oposição, os mecanismos imuno-mediados parecem ter um papel importante nas patologias renais. No que diz respeito aos dois mecanismos fisiopatológicos, parecem ter igual importância na pele, músculos, articulações e lesões oculares [43].

- **Lesões nos linfonodos**

Nos linfonodos pode-se observar hipertrofia cortical e/ou medular, e presença de vários macrófagos infetados (sendo a linfadenopatia periférica um dos sinais clínicos mais típicos de Leishmaniose) [43].

- **Lesões cutâneas**

As lesões cutâneas são muito comuns, estando presentes em cerca de 80-90% dos casos de leishmaniose canina. A dermatite localizada, multifocal ou difusa, geralmente com distribuição simétrica, está presente em cerca de 53-73% dos casos e caracteriza-se por descamação e espessamento da pele, com ou sem alopecia, eritema e hiperpigmentação. Histologicamente existe inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa que pode ser perivascular, intersticial, nodular e/ou periadnexal, e pode-se estender ao pânículo. Pode ocorrer o aparecimento de nódulos cutâneos (cuja distribuição pode ser generalizada) principalmente nas zonas torácicas, lombares e falanges, e histologicamente podem observar-se focos de necrose e infiltração cutânea perifolicular, periglandular e perivascular (por linfócitos, macrófagos, outras células e parasitas). As úlceras cutâneas (em 15-40% dos casos) são normalmente vistas na margem dos pavilhões auriculares, pontos de pressão, membros e junções mucocutâneas, e são atribuídas a trauma local ou dano vascular. A dermatite papular pode ser observada, correspondendo aos diferentes locais de inoculação do parasita. Outras manifestações cutâneas menos comumente observadas incluem: a dermatite pustular; a alopecia localizada (em redor dos olhos é o mais comum); a despigmentação nasal; a hiperqueratose nasal e das almofadas plantares; a onicogribose (onde existe inflamação na base da unha e pele adjacente); as lesões do tipo granuloma/piogranuloma; a dermatofibrose nodular não acompanhada por envolvimento renal ou uterino; as lesões semelhantes às do tipo de lambadura acral; as lesões hemorrágicas devido a vasculite; a pioderma superficial e/ou profunda e aumento das populações de *Malassezia pachydermatis* [43]. Um estudo conduzido por Ordeix *et al.*, permitiu concluir que a pele com aspeto normal de cães infetados no estágio I, possui menos probabilidade de apresentar lesões microscópicas e menos carga parasitária, em comparação com cães infetados em estádios moderados a severos [48].

- **Lesões na medula óssea**

A inflamação granulomatosa da medula óssea pode ser acompanhada por: aumento da percentagem de linfócitos, de células plasmáticas e eritróides; hipoplasia e/ou displasia de megacariócitos; aumento do rácio mielóide/eritróide e eritrofagocitose (o que pode explicar parcialmente a anemia e trombocitopenia usualmente observadas) [43].

- **Lesões no baço**

Também a esplenomegália é uma manifestação comum (a qual tem origem na proliferação e/ou infiltração de células imunes e hiperplasia), embora possa não ser detectada por palpação abdominal até esta ser demasiado severa. Numa fase inicial, histologicamente pode-se constatar o desenvolvimento da polpa vermelha do baço, com proliferação de macrófagos e plasmócitos, e uma redução de linfócitos das linhas germinativas linfóides. Já numa fase crónica, o baço pode encontrar-se atrofiado com consistência aumentada e cápsula espessada, onde se observa infiltração de folículos linfóides por plasmocitoblastos e plasmócitos. Também a polpa branca parece atrofiada e ocorre proliferação de histiócitos com parasitas no seu interior [43].

- **Lesões hepáticas**

As lesões no fígado também são relativamente comuns, pois quase todos os casos observados possuem lesões microscópicas (e não só ocorre infiltração de macrófagos, bem como de células de *Kupffer* e hepatócitos). Além destas, a inflamação crónica granulomatosa de severidade variada pode estar inicialmente confinada aos sinusóides e posteriormente pode se difundir e envolver áreas portais, da cápsula ou tornar-se difusa [49]. Ao contrário do que ocorre em cães resistentes, os granulomas de fígado de cães suscetíveis não são bem organizados e não eliminam eficazmente o parasita. Outros achados histológicos incluem hipertrofia/hiperplasia de células de Kupffer, degeneração e necrose dos hepatócitos, fibrose e raramente amiloidose. A hepatomegália é um achado mais comum no *post-mortem* do que no exame físico, e é o resultado de infiltração de células inflamatórias, de hipertrofia/hiperplasia, e da congestão passiva. As patologias associadas ao fígado são de grande importância porque podem contribuir para outras alterações clínico patológicas (por exemplo, hipoalbuminémia e aumento da atividade das enzimas no soro) [43].

- **Lesões intestinais**

As lesões intestinais são associadas a reação inflamatória piogranulomatosa ou granulomatosa e à presença do parasita (podendo levar a diarreia crónica de intestino delgado e/ou cólon, colites crónicas ou até permanecer subclínicas) [43]. Tal como referido por Pinto *et al.*, estudos anteriores demonstraram a presença de um exsudado inflamatório crónico composto por macrófagos, células plasmáticas e linfócitos, na mucosa do intestino delgado e cólon de cães infetados. Após a análise imunohistoquímica, também se observou a presença de formas amastigotas intracelulares, bem como uma reação inflamatória crónica em todos os segmentos do trato gastrointestinal (mais evidentes no ceco e cólon) [50].

A perda de peso pode ser um sinal de Lcan e é atribuída à anorexia, devida à competição entre o parasita e o hospedeiro por nutrientes essenciais como o triptofano, à absorção intestinal reduzida ou à patologia renal.

- **Lesões nos músculos, articulações e ossos**

As lesões inflamatórias de músculos esqueléticos são muito comuns e geralmente manifestam-se como atrofia muscular generalizada (com início nos músculos mastigadores e demarcação acentuada das saliências ósseas). Estas podem ser acompanhadas por alterações electromiográficas e por vezes aumento da atividade sérica da creatinina fosfoquinase. A polimiosite pode ocorrer (atribuída à inflamação granulomatosa), devido à presença de parasitas nos macrófagos e fibras musculares, deposição de complexos imunes e produção de autoanticorpos contra as miofibrilas [50]. Um estudo realizado por Ferraro *et al.*, concluiu que a maioria dos cães infetados por *L. infantum* apresenta polimiosite crónica, mesmo que não apresentem sinais clínicos compatíveis com comprometimento muscular [51].

As lesões de articulações resultam principalmente em erosões simétricas bilaterais, poliartrite e consequente claudicação. Quando não são erosivas estão associadas a sinovite, apresentando edema e aumento de temperatura [52]. Estas lesões devem-se a inflamação granulomatosa por ação de formas amastigotas que provocam infeção na membrana sinovial [53]. Também pode ocorrer uma reação de hipersensibilidade de tipo III (com recrutamento neutrofílico) pela deposição de complexos imunes circulantes, que provocam a destruição da membrana através da libertação de enzimas proteolíticas [52].

Nos ossos podem se verificar lesões osteolíticas (na cortical e medula) e osteoproliferativas (no perióstio e medula óssea), resultantes da inflamação granulomatosa [53]. Esta inflamação por sua vez, tem origem na disseminação hematogénea do parasita [43].

- **Lesões do aparelho genital**

Tal como referido anteriormente, é comum apenas surgirem lesões no aparelho genital masculino. Desta forma, as lesões histológicas da genitália masculina incluem: orquite intersticial linfoplasmocítica (com degeneração testicular secundária), epididimite histiolinfocítica, inflamação granulomatosa do pénis e balanopostite histioplasmocítica [43]. Estas lesões levam a alterações morfológicas dos espermatozóides e presença e eritrócitos no esperma [53]. O envolvimento da mucosa pode ocorrer (embora raro) e manifesta-se geralmente por lesões ulcerativas [43].



- **Lesões renais**

As lesões renais são consideradas as principais responsáveis pelo curso fatal em alguns casos de Lcan, estando presentes na grande maioria dos doentes (que apresentam ou não sinais clínicos) [54]. Estas quase sempre envolvem glomerulonefrite, nefrite tubulointersticial, e raramente amiloidose [55].

A deposição de complexos imunes nos glomérulos é a causa da glomerulonefrite, enquanto que as lesões tubulointersticiais aparecem secundariamente à patologia glomerular e inflamação induzida por deposição de complexos imunes (no interstício renal e membranas basais tubulares). Estas lesões explicam a proteinúria e podem resultar em hipertensão (que pode exacerbar a patologia glomerular), levando a síndrome nefrótica e a falha renal crónica [43].

Por vezes, as lesões renais podem ser a única manifestação clínica num animal [53].

- **Lesões oculares**

Quase todas as estruturas oculares estão envolvidas na patologia da Lcan, e existem diversos mecanismos que provocam essas lesões: inflamação granulomatosa secundária à presença do parasita (causa p. ex.: blefarite, conjuntivite primária ou inflamação da glândula lacrimal); deposição de complexos imunes (causa p. ex.: uveíte); lesões de outras estruturas oculares (conjuntivite secundária devido ao envolvimento palpebral ou lacrimal, queratite posterior a conjuntivite, queratoconjuntivite seca devido à inflamação da glândula lacrimal e conjuntivite devido à inflamação causada por obstrução do ducto lacrimal); manifestações sistémicas (p. ex.: descolamento de retina devido a hipertensão sistémica) [43].

- **Lesões vasculares, cardíacas e pulmonares**

As lesões vasculares podem ocorrer secundariamente a: trombocitopénia, trombocitopenia, hiperviscosidade associada à hiperglobulinémia, rinite, ulceração nasal e vasculite por complexos imunes.

A pneumonia é rara, mas está associada a deposição de complexos imunes e infeções secundárias devido à imunossupressão [43].

As lesões do miocárdio são consideradas pouco frequentes, podendo ocorrer lesões não supurativas no miocárdio e pericardite fibrinosa, por causa de inflamação granulomatosa, deposição de complexos imunes e hipertensão sistémica (que causa aumento da pós-carga e stress sobre as paredes do coração) [53, 56].

- **Lesões do sistema nervoso**

O envolvimento do sistema nervoso central é bastante raro e pode justificar alterações comportamentais, convulsões, sinais clínicos sugestivos de meningite e hemorragias espinais. Estas últimas, por sua vez podem ter origem em inflamação granulomatosa pela presença de parasitas, vasculite e deposição de complexos imunes [43].

#### **1.1.2.4 Quadros clínicos**

Tal como referido anteriormente, a Lcan é uma doença complexa, cujos sinais clínicos são muito variáveis e dependentes de diversos fatores (do vetor, da espécie de *Leishmania*, da imunidade do hospedeiro, etc.). A maioria dos sinais clínicos tem origem na acumulação de complexos imunes nos tecidos e órgãos e na proliferação de macrófagos infectados. Está descrito que o período de incubação pode estar compreendido entre os 3 meses e 6 anos, e portanto podem ocorrer diversas alterações desde o momento da infeção [54].

Segundo Ciaramella *et al.* e Koutinas *et al.*, os sinais clínicos mais frequentemente observados são: linfadenomegália (65,2 – 88,7% dos casos), alterações cutâneas (6 a 81%), perda de peso (25,3 a 32%), onicogrifose (24 a 30,5%), esplenomegália (9,5 a 53,3%), lesões oculares (16 a 24,1%), anorexia (16,5 a 18%), epistaxis (3,8 a 10%) e diarreia crónica (3 a 3,8%) [55, 57]. A forma mais comum de linfadenomegália é a generalizada (embora também possa ser apenas local) e caracteriza-se pela hipertrofia e aumento de consistência dos linfonodos (sendo o pré-escapular e o poplíteo os mais afetados) [54].

As manifestações cutâneas mais comuns são: alopecia difusa, simétrica e não pruriginosa em torno da cabeça, mais especificamente periocular (Figura 4); hiperqueratose; despigmentação; dermatite esfoliativa localizada (principalmente na face ou pavilhões auriculares) ou generalizada; e lesão nodular (“cancro de inoculação”) no local da picada do vetor localizada (geralmente na ponta do focinho ou face interna do pavilhão auricular). Associadas à dermatite podem surgir ulcerações focais não dolorosas e não pruriginosas, especialmente na face interna do pavilhão auricular, mucosas e junções muco-cutâneas, almofadas plantares e pontos de pressão (Figura 5). Também tem sido notada a presença de nódulos intracutâneos, que correspondem à acumulação de células inflamatórias com amastigotas no seu interior. Estes localizam-se preferencialmente nas pálpebras e membrana nictitante.

Além destes, pode ainda ocorrer atrofia muscular (principalmente dos músculos masséteres e temporais), depressão e astenia (embora sejam mais raros).

A epistáxis surge em alguns cães, e esta parece estar associada a inflamação da mucosa nasal, que por sua vez pode estar relacionada com ulceração e vasculite causadas pela presença de formas parasitárias no local [54].

As manifestações oculares que podem ser observadas mais comumente incluem blefarite difusa, conjuntivite, queratoconjuntivite bilateral e uveíte anterior (surgindo raramente glaucoma como consequência) [55].

A diarreia crônica (hemorrágica ou não) pode surgir associada a inflamação provocada por amastigotas de *Leishmania spp.*.

Associados a patologias renais podem surgir vários sinais clínicos, mas os mais frequentes são a poliúria/polidipsia, e os mais raros são o vômito, a hematemese e a melena. Por vezes, a proteinúria em cães aparentemente saudáveis, é a única manifestação clínica que podemos obter como possível causa de glomerulonefrite [53].

Além destes, podem surgir outros sinais clínicos mais raros e que podem tornar o diagnóstico mais difícil. Desses sinais, destacam-se: claudicação (devido a poliartrite, sinovite, periostite e osteomielite osteolítica); nódulos nas mucosas (lingual, gengival e peniana); e sinais neurológicos (ataxia, parésia, paralisia, convulsões e neuralgia). Caso exista imunossupressão, é possível que surjam coinfeções (erliquiose, riquetsioses, demodecose, babesiose, entre outros) as quais também podem dificultar o diagnóstico.

As alterações laboratoriais são majoritariamente hematológicas, sendo que a anemia normocítica e normocrômica é o achado hematológico mais comum. No entanto, a anemia pode ter origens diversas: perda de sangue (p. ex.: por epistaxis), hemólise (p. ex.: autoanticorpos, complexos imunes, reduzida fluidez da membrana dos eritrócitos), diminuição da eritropoiese (p. ex.: anemia de infecção crônica, deficiência em ferro, falha renal crônica, displasia eritróide) ou doenças concomitantes (p. ex.: erliquiose) [43]. Também se pode observar: neutrofilia (associada a inflamação sistêmica, principalmente nos casos em que ocorrem lesões cutâneas ulcerativas ou infecções bacterianas secundárias); leucopénia (devido à presença de parasitas na medula óssea, que diminuem a hematopoiese e causam disfunção medular); trombocitopénia (devido à destruição imuno-mediada de plaquetas circulantes); aumento do tempo de trombina; aumento do tempo parcial de tromboplastina e aumento dos produtos de degradação do fibrinogénio.

Também podem ocorrer alterações bioquímicas tais como hiperproteinémia com hiperglobulinémia e hipoalbuminémia (que se traduz numa diminuição do rácio albumina/globulina). [55, 57, 58] Essa hiperglobulinémia ocorre após um aumento das globulinas  $\beta$  e  $\gamma$ , que se pensa ser devido a uma estimulação policlonal dos linfócitos B, bem como por uma síntese de anticorpos não específicos e presença de complexos imunes no sangue. Também a hipergamaglobulinémia está presente em 80% dos cães infetados.

Ocorre proteinúria em 70% dos animais sintomáticos e azotémia (devido a ureia e creatinina elevadas), e esta caracteriza-se por um rácio de proteína:creatinina elevado. [55]. Quando ocorre lesão hepática, existe alteração das enzimas AST (aspartato amino transferase), ALT (alanina amino transferase) e FAS (fosfatase alcalina sérica) [59].



Figura 4 – Alopecia periocular e bleferite num cão com Lcan. Fotografia gentilmente cedida por Dr. Nuno Alexandre.



Figura 5 – Alopecia, descamação e úlcera em ponto de pressão do MPE. Fotografia gentilmente cedida por Dr. Nuno Alexandre.

#### **1.1.2.5 Diagnóstico**

##### **1.1.2.5.1 Clínico**

Uma vez que a Leishmaniose canina pode apresentar-se de diversas formas, é necessário obter o máximo de informações possíveis sobre o animal infetado através do exame físico e observação de sinais clínicos, sobre a sua história clínica, achados laboratoriais básicos e utilizando testes específicos (parasitológicos, molecular e imunológicos) [2].

Devem-se registar os sinais clínicos observados, em especial se forem compatíveis com os que são comumente reportados [59].

No que diz respeito à história clínica, o médico veterinário deve recolher o máximo de informações possíveis, pois estas podem auxiliar a compreender o aparecimento e desenvolvimento da doença. Apesar de todas as raças e sexos poderem ser afetados, sabe-se que podem existir algumas raças predispostas e que o parasita parece ter “preferência” por animais do sexo masculino. A idade também é relevante, pois apesar de ser possível ocorrer

infecção em qualquer idade, existe uma distribuição bimodal na sua prevalência. É importante saber em que local o animal vive ou se viajou para alguma zona endémica, bem como saber a história do mesmo (os aspetos clínicos, se está sujeito a terapêuticas imunossupressores, entre outros) [2].

Deve-se ter um cuidado especial no que diz respeito aos diagnósticos diferenciais, pois existem muitas outras patologias que mimetizam os sinais clínicos da Lcan, como por exemplo algumas patologias que podem causar epistaxis (tais como aspergilose ou neoplasias nasais) ou algumas doenças linfoproliferativas que resultam em linfadenomegália. Também é necessário ter em conta que algumas doenças infecciosas, tais como a Babesiose, a Erliquiose, a Hepatozoonose ou a Anaplasmoze, podem coexistir com a Leishmaniose [54].

#### 1.1.2.5.2 Laboratorial

Tal como referido anteriormente, a Lcan pode provocar uma vasta lista de sinais clínicos que são muito variáveis de caso para caso, e por isso é importante estabelecer um estadiamento de cada situação de forma a permitir um diagnóstico e plano de terapêutica mais adequado. Para tal, foram criadas guidelines que combinam critérios clínicos e laboratoriais e que permitem diferenciar animais expostos, infetados e animais doentes [58]. Estas constituem os critérios de classificação elaborados pelo *Canine Leishmaniasis Working Group* (Tabela 1):

Tabela 1 – Critérios de classificação de cães com Lcan, do *Canine Leishmaniasis Working Group*[58]

Classificação	Critérios
<b>Cães expostos</b>	Possuem títulos serológicos positivos baixos, e são negativos por PCR e/ou citologia.
<b>Cães infetados</b>	Possuem valores hematológicos e bioquímicos normais, mas são positivos por PCR e/ou citologia em medula óssea, linfonodos, baço, pele ou sangue periférico.
<b>Cães doentes</b>	Possuem alterações clínicas ou clinico patológicas típicas.
<b>Cães doentes severos</b>	Possuem condições clínicas severas, tais como nefropatia proteinúria, falha renal crónica e com problemas concomitantes (relacionados ou não com Lcan), tais como: doenças oculares, doenças articulares severas, co-infecções, neoplasias e doenças endócrinas ou metabólicas. Também inclui doentes que não respondem aos ciclos repetidos de terapêutica para Lcan.

Além desta classificação, existe outra elaborada por um grupo conhecido por Leishvet, que permite distinguir 4 estádios diferentes de acordo com a severidade dos sinais clínicos,

achados clínico patológicos e serológicos nos cães infetados. Esta classificação pode ser observada na Tabela 2 [58].

Tabela 2 – Estadiamento clínico de leishmaniose, segundo o grupo *Leishvet*. [60]

<b>Estádio</b>	<b>Serologia</b>	<b>Sinais clínicos</b>	<b>Achados laboratoriais</b>
<b>Estádio I (doença ligeira)</b>	níveis de Ac: negativos ou positivos baixos	Ligeiros, tais como linfadenomegália periferal ou dermatite papular.	Não se observam anormalidades clínico patológicas laboratoriais. Perfil renal normal (creatinina < 1.4 mg/dl; não proteinúrico, UPC < 0.5)
<b>Estádio II (doença moderada)</b>	níveis de Ac: positivos baixos a altos	Iguais ao estágio I + lesões cutâneas difusas ou simétricas como dermatite esfoliativa, onicogrifose, ulcerações (plano nasal, almofadas plantares, proeminências ósseas, junções mucocutâneas), anorexia, perda de peso, febre e epistaxis.	Anemia não regenerativa ligeira, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia e síndrome de hiperviscosidade do soro. Podem-se observar 2 sub- estádios renais: (perfil normal renal com creatinina < 1.4 mg/dl e UPC < 0.5; e creatinina < 1.4 mg/dl e UPC = 0.5 – 1).
<b>Estádio III (doença severa)</b>	níveis de Ac: positivos médios a altos	Iguais ao estágio II + sinais com origem nas lesões provocadas pelos complexos imunes (vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite).	Anormalidades clínico patológicas como as listadas no estádio II, e doença renal crónica (classificação pela IRIS) de estádio I com UPC > 1 ou estádio II com creatinina = 1.4 – 2 mg/dl.
<b>Estádio IV (doença muito severa)</b>	níveis de Ac: positivos médios a altos	Iguais ao estágio III + lismo pulmonar, ou síndrome nefrótica com doença renal de estágio final;	Anormalidades clínico patológicas como as do estágio II, com doença renal crónica (da classificação pela IRIS) de estádio III (com creatinina = 2-5 mg/dl) ou de estágio IV (creatinina > 5 mg/dl), e síndrome nefrótica (com marcada proteinúria e UPC > 5).

Como mencionado previamente, o diagnóstico de Lcan é considerado complexo, pois baseando-se apenas numa vasta lista de sinais clínicos e alterações clínico patológicas (em conjunto com um simples hemograma, perfil bioquímico e urianálise) pode ser inespecífico. Desta forma, é necessário elaborar uma abordagem diagnóstica adaptada para cada caso, onde se podem inserir uma lista de alterações clínico patológicas, diagnósticos diferenciais e métodos de diagnóstico específicos [60].

Posteriormente à recolha de dados (história e sinais clínicos), devem-se efetuar outros exames (nomeadamente hematológicos, bioquímicos, urianálise e análise do perfil eletroforético das proteínas do plasma) para identificar as alterações laboratoriais, e desta

forma complementar a abordagem diagnóstica [60]. Das alterações laboratoriais que podem suportar se o animal possui Leishmaniose, distinguem-se:

**1.1.2.5.2.1 Alterações hematológicas:** A neutrofilia pode existir devido a uma resposta inflamatória sistêmica (principalmente nos casos com lesões cutâneas ulcerativas e infecções bacterianas secundárias). Algumas alterações morfológicas qualitativas ou quantitativas na população leucocitária podem estar presentes mas são menos comuns (tal como linfopénia, linfocitose ou eosinofilia). As formas amastigotas podem ser raramente encontradas nos neutrófilos, linfócitos e monócitos circulantes, quando se observam esfregaços sanguíneos. Tal como referido anteriormente, o achado mais comum consiste na anemia normocrômica normocítica. A trombocitopénia ligeira a moderada também pode ser observada quando ocorrem infecções concomitantes (ex.: Eritiquiose), quando existe destruição periférica imuno-mediada de plaquetas circulantes por anticorpos anti-plaquetários, ou quando está associada com hipercoagulabilidade (causada por diminuição da concentração de antitrombina III, devida a nefropatia). Por fim, a Coagulação intravascular disseminada (CID) também foi descrita em alguns casos [58].

**1.1.2.5.2.2 Alterações da medula óssea:** A citologia de medula óssea pode complementar um perfil hematológico e pode ser altamente diagnóstica, através da identificação de amastigotas nos macrófagos ao microscópio. Além disso, permite a avaliação quantitativa da frequência de macrófagos infetados, bem como da carga parasitária e achados anormais (p. ex.: hipoplasia eritróide). Também permite identificar inflamação da medula óssea ou mielite (número aumentado de macrófagos, infetados ou não, acompanhados de eritrofagia, aumento do número de neutrófilos maduros e plasmocitose marcada a moderada). Numa citologia de medula óssea de um animal com Lcan é comum encontrar: diseritropoiese com mitoses anormais; maturação assíncrona nucleo-citoplasmática (displasia); fragmentação nuclear e/ou maturação; e dismegacariopoiese com megacariócitos anões. Menos frequentemente pode se observar hiperplasia dos megacariócitos, disgranulopoiese com maturação de granulócitos e dismielopoiese secundária associada a hiper celularidade. [58].

**1.1.2.5.2.3 Alterações hemostáticas:** As alterações hemostáticas são menos comuns em cães com Lcan. No entanto, o tempo de tromboplastina parcial ativada e tempo de protrombina podem estar prolongados (e podem resultar de CID, apesar de ser raro) [58]. A hipercoagulabilidade pode ser comum caso possuam nefropatia com perda severa de proteína, a qual se deve a perda glomerular de anti-trombina III (que previne a conversão de fibrinogénio em fibrina). A síndrome de hiperviscosidade (devido a aumento de globulinas circulantes) também favorece a hipercoagulabilidade, e esta por sua vez pode ser demonstrada pelo reduzido tempo de formação de coágulo e aumento de força global do coágulo (usando

tromboelastografia). No entanto, no caso de cães com Lcan, está provado que a formação de coágulo por tromboelastografia se encontra dentro dos limites normais [58].

**1.1.2.5.2.4 Avaliação de parâmetros bioquímicos e outros:** Tal como os sinais clínicos, as alterações do perfil bioquímico são variáveis de caso para caso. As mais frequentes são as disfunções renais, inflamações e reações imunes. Também podem estar alterados biomarcadores de disfunção hepática ou pancreática, enzimas dos músculos esqueléticos e do cérebro, entre outros [58]. Dentro destas, podemos distinguir:

**1.1.2.5.2.4.1 Avaliação da função hepática:** Podem ocorrer aumentos ligeiros a moderados em algumas enzimas hepáticas, tais como a AST, a ALT, a bilirrubina total e os ácidos biliares séricos pós-prandiais, sendo por isso importante o seu controlo [61].

**1.1.2.5.2.4.2 Avaliação da função renal:** Como referido anteriormente, as alterações inflamatórias são provocadas pela deposição de complexos imunes circulantes a nível glomerular, que levam a nefropatia proteinúrica e consequentemente a doença renal crónica. A abordagem clínica e laboratorial nestes casos deve ser a que está descrita nas *guidelines* da *IRIS (International Renal Interest Society)*, que incluem a medição da pressão arterial, e a quantificação de proteínas urinárias e marcadores de função renal (tais como densidade urinária e concentração de creatinina). Apesar desta última estar frequentemente aumentada nos casos de leishmaniose canina, não é suficiente para detetar casos em estádios iniciais. É importante monitorizar a azotémia (que indica a taxa de filtração glomerular dos compostos azotados), e por isso é recomendada a verificação dos valores de creatinina (CRE), ureia (BUN) e fósforo [61].

A medição direta da taxa de filtração glomerular através de testes do *clearance* deve ser o melhor método para compreender a funcionalidade real dos rins. Alguns marcadores de inflamação tal como a ferritina, a proteína reativa C e a adiponectina podem estar aumentadas na urina, geralmente devidas a inflamação sistémica e não necessariamente devidas a doença renal crónica. A disfunção tubulointersticial pode-se desenvolver em consequência da proteinúria causada pelo dano glomerular em cães infetados [58].

**1.1.2.5.2.4.3 Alterações na urianálise:** Deve-se medir a densidade urinária num refratómetro utilizando urina centrifugada, pois esta tende a diminuir em cães com dano tubulointersticial devido à perda da função concentradora. Deve-se realizar uma tira urinária com o sobrenadante da centrifugação, para medição do pH e proteínas (tendo em conta que pode ocorrer uma sobrestimação de proteinúria em urina alcalina). A análise ao sedimento deve ser feita para verificar a existência ou não de sedimento ativo (presença de números elevados de leucócitos, eritrócitos e bactérias), que pode indicar a existência de uma infeção do trato



urinário, e assim sobrestimar também a proteinúria. Além destes, deve-se constatar a presença ou não de cilindros granulares ou celulares que podem ser indicativos de dano tubular [58].

**1.1.2.5.2.4.4 Avaliação da proteinúria:** A avaliação da proteinúria deve ser feita pois constitui um fator de risco para a progressão da nefropatia. Deve-se fazer colheita de urina através de cistocentese para evitar contaminação pelo trato urinário inferior, sendo primeiramente investigada utilizando uma tira urinária. Caso seja negativo o resultado, é provável que o animal seja não-proteinúrico, segundo a classificação IRIS. Pelo contrário, se a tira tiver resultados positivos fracos associados a baixa densidade urinária ou positivos fortes independentemente da densidade, o cão é provavelmente proteinúrico. Neste caso, para classificar o nível de proteinúria, deve-se determinar o rácio proteína urinária:creatinina (UPC). Segundo a classificação *IRIS*, cães não proteinúricos têm um rácio UPC < 0.2, a proteinúria *borderline* varia entre 0.2 a 0.5, e cães proteinúricos têm um rácio UPC > 0.5. Esta medição de proteinúria deve ser avaliada frequentemente para verificar a eficácia da terapêutica aplicado e se é necessário alguma alteração ao mesmo.

De acordo com as guidelines da *IRIS*, é recomendada a realização de biópsia renal quando existe uma progressão rápida de doença renal crónica, ou em casos em que não há resposta aos terapêuticas efetuados [58].

**1.1.2.5.2.4.5 Avaliação das reações inflamatórias imunes:** Os cães com sinais clínicos de Lcan possuem uma resposta inflamatória intensa, e produzem quantidades significativas de várias moléculas que estão envolvidas na resposta imune (por exemplo, anticorpos). Existem vários testes (p. ex.: a eletroforese de proteínas séricas e a medição de proteínas de fase aguda) para monitorizar esses mecanismos.

A análise de proteínas séricas (incluindo a eletroforese) pode indicar anomalias logo nos estádios iniciais de doença.

Constatou-se que é comum estarem aumentadas as proteínas totais e globulinas totais, e sabe-se que esses aumentos estão relacionados com a severidade da doença. A única exceção é a albumina, que diminui por ser uma proteína de fase aguda negativa, mas também se pode dever ao facto de se perder com nefropatia proteinúrica, resultando numa diminuição do rácio albumina-globulina (A/G). A diminuição desse rácio, é considerada por alguns autores como um dos testes mais sensíveis para Lcan, e a hipoalbuminémia é considerada um fator de prognóstico negativo.

O proteinograma típico de cães com sinais clínicos de leishmaniose (Figura 6) consiste em: hipoalbuminémia com um aumento moderado de  $\alpha_2$ -globulinas (que inclui a maioria de proteínas de fase aguda), e um aumento marcado de  $\gamma$ -globulinas (devido aos altos títulos de anticorpos circulantes, complexos imunes e outras moléculas com carga e massa iguais às  $\gamma$ -globulinas). Podem ocorrer ocasionalmente picos de anticorpos circulantes na região  $\beta$ , onde podem migrar IgM e algumas proteínas de fase aguda. A gamopatia no caso da leishmaniose é

tipicamente policlonal, mas por vezes pode aparecer biclonal ou monoclonal (e pode depender do tipo de eletroforese). Os picos monoclonais além de associados à leishmaniose, podem também ser relacionados com doenças concomitantes perpetuadas por vetores ou mieloma múltiplo. As citocinas pro-inflamatórias produzidas durante uma resposta de fase aguda estimulam a liberação de neutrófilos, ativam a mielopoiese e modulam a síntese de proteínas no fígado. Esta última leva a uma diminuição da concentração sérica de proteínas de fase aguda negativas e um aumento das positivas (que incluem imunomoduladores, proteínas transportadoras, antiproteases e outras proteínas envolvidas na defesa do hospedeiro) [58].

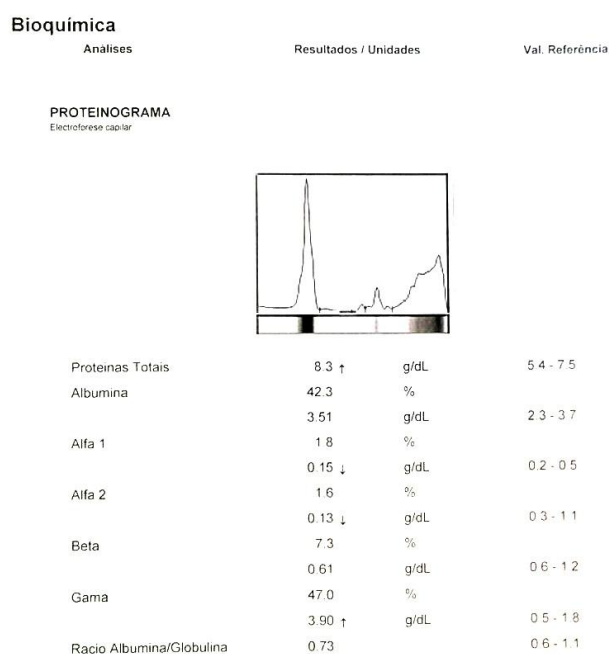


Figura 6 – Exemplo de boletim de resultados de uma análise de proteinograma de um animal com Lcan. Fotografia gentilmente cedida por laboratório veterinário INNO.

Em relação aos métodos de diagnóstico etiológico, estes podem ser diretos ou indiretos. Os diretos são usados para confirmar a presença do parasita ou dos seus componentes e constituem: a análise citológica, a análise histológica, a cultura de parasitas e a análise por PCR. Os métodos indiretos são usados para verificar a resposta do hospedeiro ao parasita e podem ser testes de serologia e avaliação da resposta imunitária celular ou humoral [59]. No entanto, testes indiretos positivos podem ou não ser compatíveis com infecção atual, ao contrário dos testes diretos positivos que demonstram que o cão está atualmente infetado [58].

#### **1.1.2.5.3 Métodos diretos**

**1.1.2.5.3.1 Citologia:** Consiste num método eficaz de diagnóstico por causa do seu mínimo custo, requisitos mínimos de equipamento técnicos, rápida avaliação e por ser muito específico. No entanto, a sensibilidade do diagnóstico depende da qualidade das preparações, da experiência do operador e do tempo dedicado à avaliação feita (nº de campos avaliados) [61]. Apesar de ser considerado 100% específico, a sensibilidade pode variar entre 30 a 100% no caso de esfregaços de linfonodos realizados por punção aspirativa, e entre 6.2 a 100% no caso de esfregaços por aspiração de medula óssea. Contudo, no caso de animais com sinais clínicos evidentes, a sensibilidade pode aumentar, uma vez que estes possuem maior carga parasitária [62].

No caso de existirem lesões cutâneas papulares, nodulares e hipertrofia de linfonodos, a colheita de material para citologia deve ser realizada através de uma punção aspirativa por agulha fina, por oposição ao que acontece em lesões cutâneas ulcerativas ou lesões nasais, em que deve ser realizada a colheita por raspagem, aposição ou escovagem [58]. Quando estão presentes sinais clínico patológicos compatíveis com Lcan, também devem ser investigados os fluidos corporais tais como líquido sinovial, efusões ou líquido cefalorraquidiano.

Em seguida à recolha, devem-se corar os esfregaços com corantes *Giemsa* ou *Diff-Quick* e proceder à visualização ao microscópio numa ampliação de mil vezes [2].

O objetivo da citologia consiste em identificar a presença intracelular (nos macrófagos) ou extracelular (quando a carga parasitária é alta e ocorre lise celular) de formas amastigotas. Esta identificação pode tornar-se difícil no caso de lesões ulcerativas cutâneas, pois microscopicamente a presença de necrose ou bactérias contaminantes pode mascarar a presença de formas parasitárias.

O padrão citológico típico associado a leishmaniose, é composto por inflamação granulocítica-macrofágica ou piogranulomatosa, associada a uma infiltração linfoplasmática na pele ou lesões nodulares com localização atípica. Nos linfonodos é característica uma hiperplasia reativa de vários graus, com infiltração linfoplasmática e presença de macrófagos e neutrófilos. Quando existem padrões citológicos consistentes com Lcan mas não se detecta a presença de formas parasitárias, esta não deve ser descartada pois a sensibilidade deste método é baixa e devem-se realizar testes adicionais mais sensíveis (p. ex.: PCR) [58].

**1.1.2.5.3.2 Histologia:** Este método permite identificar o parasita em secções histológicas coradas com a coloração de rotina hematoxilina-eosina (geralmente quando é realizada anteriormente uma citologia e apesar do resultado da mesma ser negativo, o padrão é consistente com Lcan) [62].

Comparativamente com o PCR e a citologia, a histologia possui algumas desvantagens: é mais trabalhosa e demorada; a identificação das formas parasitárias é mais difícil do que em citologia; o custo do meio de diagnóstico é mais elevado; possui baixa especificidade; e é um método bastante invasivo [61]. No entanto, as formas amastigotas podem ser confirmadas através de outras técnicas tais como imunohistoquímica, hibridização *in situ*, ou PCR em amostras fixadas com formol ou embebidas em parafina.

Por outro lado, a vantagem desta técnica é que permite obter informação adicional sobre a arquitetura e padrão celular das lesões, sendo por isso referido em algumas *guidelines* que este método deve ser sempre realizado.

O padrão típico de leishmaniose consiste em inflamação linfoplasmática, granulomatosa ou piogranulomatosa, e/ou vasculite em qualquer dos órgãos afetados [58].

É considerada comum a análise de biópsias cutâneas de lesões suspeitas de leishmaniose com recurso à histologia, em que o principal intuito não é a identificação do parasita mas sim descartar outros diagnósticos diferenciais que possam existir [61].

**1.1.2.5.3.3 Cultura de parasitas:** As culturas de parasitas *in vitro* consistem em métodos muito específicos que permitem a identificação de promastigotas viáveis. Estas são realizadas em meio de agar com componentes frescos, e apesar de serem o único método capaz de isolar e manter a população infetante original, também possuem as desvantagens de terem um longo período de incubação (até 30 dias) e terem de ser realizadas em laboratórios especializados [2].

**1.1.2.5.3.4 Técnicas de PCR (Polimerase Chain Reaction):** Estas consistem na utilização de métodos moleculares que detetam o ADN do parasita em vários tecidos biológicos, e os mais utilizados na prática clínica são o PCR convencional, o *nested* PCR e o qPCR (*real-time*). Estes são úteis no diagnóstico de Lcan nos locais onde existem reações serológicas cruzadas (principalmente com *Trypanosoma spp.*) ou quando existem resultados serológicos duvidosos [63]. A sensibilidade e especificidade variam consoante a técnica e a sequência alvo de ADN utilizadas, sendo que a maioria dos testes de PCR utilizados têm como alvo sequências de ADN, tais como pequenas subunidades ribossomais de genes de ARN ou ADN de kinetoplastos, aumentando a sensibilidade do teste [58].

Além destes fatores, também podem depender dos *primers* utilizados, do método de extração, do número de cópias de ADN presentes na amostra, do protocolo seguido e do tipo de amostras recolhidas [64]. O qPCR quando comparado com o PCR convencional ou o *nested* PCR, possui duas vantagens: pode ser realizado em sistemas fechados e por isso é menos predisposto a contaminação, e providencia informação sobre o número de cópias de ADN presentes na amostra [58]. Além disso, quando comparado com o PCR convencional, que consegue detetar uma carga parasitária superior ou igual a 30 formas parasitárias por 1ml, o qPCR permite a deteção de menos de uma forma parasitária por um ml [63]. Quando se utiliza

o qPCR no momento do diagnóstico (anteriormente à terapêutica) e durante a monitorização da eficácia da terapêutica, este permite estabelecer um valor base para comparação com os resultados posteriores. No entanto, nem todos os laboratórios oferecem métodos standardizados para identificar corretamente as cópias de ADN. Estas técnicas podem ser aplicadas a todos os tecidos ou fluidos biológicos, e podem ser também aplicadas a materiais colhidos anteriormente para outros testes (material fixado anteriormente em lâminas para citologia, material fixado em formol ou embebido em parafina) [58]. Quando não existem lesões evidentes para punção aspirativa por agulha fina ou biópsia (quando só existem sinais clínicos de anemia ou nefropatia proteinúrica), deve recolher-se material de outros locais onde a prevalência é potencialmente alta (tais como medula óssea e/ou linfonodos e baço). Estudos recentes sugeriram que a utilização de esfregaços da conjuntiva, nasais e orais podem providenciar diagnósticos positivos mais cedo que em outros tecidos [61]. No entanto, o sangue ou *buffy coat* podem ser usados nos testes de PCR convencional e qPCR, e apesar da sensibilidade ser mais baixa em relação a outros tecidos, a colheita é menos invasiva e providenciam um resultado mais rápido e acessível quando são positivos. Quando se detecta o ADN do parasita, o resultado é considerado positivo, mas deve-se correlacionar com a presença de sinais clínicos ou anomalias laboratoriais, para diferenciar animais infetados de animais com doença clínica. Nestes casos, quando se detecta o ADN do parasita em lesões com padrões citológicos ou histológicos compatíveis com leishmaniose, ou se detecta o ADN no sangue ou medula óssea quando existem sinais clínicos sistémicos, pode-se concluir que o animal exibe doença clínica. Pelo contrário, resultados PCR positivos em cães sem sinais clínicos não devem ser considerados como doença clínica, uma vez que podem existir resultados PCR positivos transitórios alguns meses após a exposição aos flebótomos sem que o animal esteja efetivamente infetado ou doente [58].

#### **1.1.2.5.4 Métodos indiretos**

##### **1.1.2.5.4.1 Serologia:**

Os testes serológicos detetam e quantificam os anticorpos (IgG) presentes no soro ou plasma. Como nem todos os cães fazem seroconversão após a infeção, é difícil determinar quando esta ocorreu em cães naturalmente infetados. Os anticorpos podem ser encontrados no sangue, um mês após a exposição, e estima-se que a seroconversão ocorra em média aos cinco meses em condições naturais de infeção.

Se a carga parasitária está controlada de forma eficaz pela resposta imune do hospedeiro, os títulos de anticorpos tendem a permanecer baixos e o animal é considerado exposto (mas clinicamente saudável, sem exibir sinais clínicos evidentes). Pelo contrário, se ocorre disseminação não controlada do parasita, há uma resposta humoral exagerada por

parte do hospedeiro, os títulos de anticorpos serão elevados e o animal exibirá sinais clínicos evidentes [58].

Apesar de existir uma relação direta entre o título elevado de anticorpos e o estado clínico severo, os títulos baixos-médios de anticorpos podem também ser detectados em cães com sinais clínicos. Desta forma, devem-se realizar sempre testes serológicos quantitativos, nos casos em que existem sinais clínicos mas a presença de parasitas não foi corretamente identificada em outros testes (como a citologia), ou quando não se observam os padrões típicos em análises citológicas mas possuem testes PCR positivos [58].

Existem diversas técnicas serológicas, mas algumas não se encontram disponíveis para a clínica de rotina e por isso não são muito utilizadas, como por exemplo o *Western Blot*, Teste de aglutinação ou Citometria de fluxo. [59]

As técnicas mais comumente utilizadas são:

**1.1.2.5.4.1.1 Teste de imunofluorescência Indireta (IFI):** Este método consiste em colocar várias diluições do soro do animal suspeito em lâminas que contêm poços revestidos com promastigotas de *Leishmania spp.*. Nos poços ocorre uma ligação específica aos anticorpos e a concentração relativa dos mesmos (título de anticorpos) é revelado após junção de anti-anticorpos fluorescentes (com isotiocianato de fluoresceína) e posterior incubação em local escuro. Em seguida, observam-se ao microscópio e as amostras positivas emitem uma fluorescência verde, enquanto as negativas emitem uma cor avermelhada fosca (Figura 7) [64]. Assim, consegue-se determinar em que titulação ocorre a ligação Ac-Ac e prevê-se a concentração de imunoglobulinas específicas [59].

É considerado como o método serológico de referência (*Gold standard*) para diagnóstico de *Leishmania spp.* devido à sua alta especificidade e sensibilidade, estimando-se que esta última possa variar entre 21,6 a 100% [64]. No entanto, a avaliação da intensidade de fluorescência pelo microscópio é considerada subjetiva, uma vez que esta é uma técnica dependente da interpretação e experiência do operador [59]. Além dos fatores dependentes do operador, podem ocorrer outros fatores analíticos, tais como estabilidade dos reagentes ou desempenho do equipamento.

Outras limitações incluem o facto de serem necessárias várias diluições do soro, o que torna um teste trabalhoso e não prático quando se fazem análises a várias amostras [64]. No Novo Mundo, nas áreas endémicas para *Trypanosoma cruzi*, podem ocorrer reações cruzadas e consequentemente resultados falso-positivos [59].

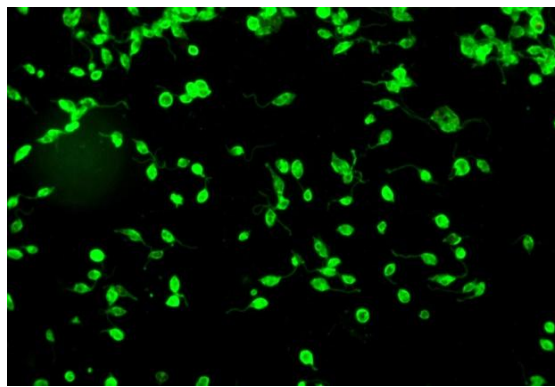


Figura 7 – Fotografia de formas promastigotas de *Leishmania spp.*, detetadas por IFI. Ampliação 400x. [65]

**1.1.2.5.4.1.2 Teste de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay):** Este método consiste em colocar (numa placa), o soro diluído do animal suspeito num poço previamente revestido por proteínas recombinantes (antigénio), e adicionar um substrato que confere cor (no caso de presença de ligações anticorpo-antigénio) para posterior leitura no espectrofotómetro (Figura 8) [59, 66]. Consoante o resultado seja positivo ou negativo, cada poço imite uma cor que pode ser mais ou menos intensa, respetivamente.

Um estudo realizado por Mettler *et al.*, em cães sintomáticos e assintomáticos, concluiu que nos primeiros a sensibilidade do teste *ELISA* foi de 100%, e nos outros foi de 94,1% [67].

Este teste constitui uma ferramenta muito útil no diagnóstico, pois possui a vantagem de poder analisar várias amostras, de forma simples e em pouco tempo. Além disso, também consegue detetar antigénios variados (no citoplasma, purificados, péptidos sintéticos e proteínas recombinantes) [64].



Figura 8 – Etapa de execução de teste comercial *ELISA*: poços com rosa, azul e amarelo constituem os controlos do kit, enquanto poços a verde constituem as amostras suspeitas diluídas. Fotografia gentilmente cedida por laboratório veterinário INNO.

**1.1.2.5.4.1.3 Teste de Imunocromatografia:** Este método consiste num teste rápido possível de realizar nas clínicas, que apenas fornece um resultado qualitativo (presença ou ausência de bandas ou pontos reativos específicos). Estes baseiam-se na junção de gotas de sangue do animal suspeito a uma placa do kit, onde o mesmo vai ser incubado em conjunto com antígenos recombinantes de *Leishmania spp.*.

As vantagens deste teste englobam a facilidade de utilização, interpretação e o facto de não ser necessário material sofisticado para a sua realização [68].

A especificidade destes testes é aceitável mas a sensibilidade é bastante baixa (entre 30 a 70%), além de serem dependentes do estágio em que se encontra o animal. Essa baixa sensibilidade é associada a cães infetados sem sinais clínicos, sendo por isso utilizada como primeira opção na abordagem clínica mas apenas como complemento ao restante diagnóstico.

No caso de se obterem resultados positivos com este teste, devem-se realizar testes de serologia quantitativa (*ELISA* ou *IFI*) para se obterem valores concretos.

No caso de se obterem resultados negativos mas o animal exibir sinais clínicos evidentes, devem-se realizar outros testes serológicos para descartar a hipótese de resultados falso negativos originados pela baixa sensibilidade [58].

Apesar de ser utilizado frequentemente para este fim, o uso deste teste como rastreio anterior à vacinação pode não ser o mais apropriado devido à sua baixa sensibilidade, pois pode levar a vacinação de cães seropositivos [68].

#### **1.1.2.6 Terapêutica**

Considerando os conhecimentos adquiridos até à atualidade, supõe-se que um cão infetado com Leishmaniose não dispõe de possibilidade de cura. Como tal, são necessárias medidas de prevenção e vigilância sanitária específicas para o cão, uma vez que este é o hospedeiro reservatório principal e possui um papel muito importante na saúde pública.

Por norma, um cão infetado que é submetido a terapêutica não alcança a erradicação total do parasita, pois apenas diminui a expressão dos sinais clínicos e a capacidade infetante para os flebótomos, mantendo-se portador da infeção. Esta pode recidivar a qualquer momento por diversas razões desconhecidas, que se pensam estar associadas a ausência de resposta imunitária complementar à ação dos fármacos, localização intracelular dos parasitas ou até à resistência parasitária para os fármacos utilizados na terapêutica.

Por causa destas razões ainda desconhecidas que condicionam os planos de terapêutica, estes devem ser adaptados a cada paciente de modo a que sejam os mais adequados e eficazes. Desta forma, não existe ainda um consenso global sobre a utilização de determinados fármacos, e estes variam consoante o país. Na Europa existem diversos fármacos e suas associações que podem ser utilizadas nos protocolos de terapêutica, os quais diferem entre cada país.



Apesar dos terapêuticos serem dispendiosos e de longa duração, na maioria dos casos os tutores optam pela terapêutica devido ao valor sentimental que nutrem pelos seus cães. No entanto, quando o estado sanitário ou imunitário do cão não permite que se realize um terapêutica eficaz e que lhe confira melhor qualidade de vida, o médico veterinário possui o dever de informar o tutor do cão infetado sobre as suas opções de escolha e como estas podem afetar a saúde pública.

Existem diferentes fármacos que são utilizados atualmente na terapêutica de Lcan. Estes podem ter vários tipos de ação: podem conter princípios ativos específicos para combater *Leishmania spp.*, ser moduladores do sistema imunitário ou ser medicamentos para controlar complicações associadas.

Para cada estágio, além de linhas gerais de diagnóstico, também existem linhas gerais para a terapêutica. Segundo as guidelines do grupo Leishvet (Tabela 3), as terapêuticas aplicadas podem ser: [60]

Tabela 3 – Guidelines *Leishvet* relativas à terapêutica em cada estágio de Lcan.

Estádios	Recomendações de terapêutica	Prognóstico
<b>Estádio I (doença ligeira)</b>	Alopurinol, Miltefosina ou Antimoniato de meglumina, como monoterapia. No caso de associações de fármacos: Alopurinol com Antimoniato de meglumina, Miltefosina com Antimoniato de Meglumina ou Alopurinol com Miltefosina.	O prognóstico associado a este estágio é considerado bom.
<b>Estádio II (doença moderada)</b>	Alopurinol com Antimoniato de meglumina ou Alopurinol com Miltefosina.	O prognóstico associado a este estágio é considerado bom a reservado.
<b>Estádio III (doença severa)</b>	Alopurinol com Antimoniato de meglumina ou Alopurinol com Miltefosina. Além desta terapia anti-leishmanial semelhante ao estágio II, recomenda-se o seguimento das “guidelines” da IRIS para a terapêutica de doença renal crónica.	O prognóstico associado a este estágio é considerado reservado a mau.
<b>Estádio IV (doença muito severa)</b>	Alopurinol. Assim como no estágio III, também se recomenda o seguimento das “guidelines” da IRIS para a terapêutica de doença renal crónica.	O prognóstico associado a este estágio é considerado mau.

#### **1.1.2.6.1 Terapia convencional**

Apesar de algumas não constarem na lista de fármacos recomendados para a terapêutica de Leishmaniose canina, sabe-se que são utilizados os seguintes como terapia convencional:

##### **1.1.2.6.1.1 Compostos Antimoniais ( $Sb^V$ ):**

São considerados como primeira opção de escolha para a terapêutica de leishmaniose em diferentes países, sozinhos ou em associação com Alopurinol. Apesar de serem considerados como primeira opção, ainda possuem diversas desvantagens: são relativamente caros; a via de administração é parenteral e por isso implicam que a sua administração deva ser realizada por um médico veterinário; e causam diversos efeitos secundários prejudiciais.

Existem dois fármacos que se destacam dentro deste grupo: Antimoniato de meglumina (Glucantime®) e Estibogluconato de sódio (Pentostam®). Estes podem ser utilizados de forma isolada (monoterapia) ou em associação com outros fármacos tais como: Alopurinol, Enrofloxacin e Miltefosina, para potenciar o seu efeito contra *Leishmania spp.*. A monoterapia destes compostos não garante uma remoção completa dos parasitas e existe uma elevada hipótese de recidiva, em especial se a terapêutica for de curta duração [69].

O seu modo de ação implica a sua transformação e ativação pelo metabolismo do parasita, através da redução dos compostos ( $Sb^V$ ) para a sua forma mais tóxica ( $Sb^{III}$ ). A conversão metabólica é favorecida pela presença de tripanotona, que é um radical livre específico presente nos parasitas protozoários como *Leishmania spp.* e *Trypanosoma spp.*. Este procedimento provoca a inibição enzimática de processos metabólicos essenciais e altera o balanço redutor de enxofre (que por sua vez, previne os efeitos tóxicos do oxigénio reativo no parasita). Desta forma,  $Sb^{III}$  compete com o zinco na sua ligação a proteínas específicas que estão envolvidas em interações de proteínas e ácidos nucleicos, causando a fragmentação de ADN que é responsável pela morte de protozoários. O  $Sb^{III}$  derivado da metabolização é responsável pela maioria dos efeitos secundários indesejáveis, tais como: distúrbios gastrointestinais, nefrotoxicidade, irritação da pele, hiperproteinémia esporádica, fadiga e recidivas. Além destes, a administração em si causa dor local severa, bem como flebotoxicidade, tromboflebite, fibrose muscular e abscessos. Se a fórmula farmacêutica contiver polissacarídeos de alto peso molecular (como o dextrano) podem ocorrer também reações de hipersensibilidade.

Os fármacos deste grupo devem ser administrados via parenteral (via intravenosa lenta, via subcutânea e via intramuscular), o que permite uma absorção relativamente rápida a partir do local de injeção, e uma fase de eliminação plasmática com uma meia-vida de duas horas, seguida por depuração urinária lenta.

Uma vez que o efeito leishmanicida depende da concentração atingida nos órgãos alvo (baço, fígado e medula óssea), são necessárias disponibilidade e distribuição de volume elevadas.

Quando se utilizam as doses recomendadas, essa concentração plasmática é mantida pela administração diária durante 30 dias.

- **Antimoniato de meglumina (Glucantime®)**: A monoterapia com este fármaco é administrada por via subcutânea com as doses de 75-100 mg/kg uma vez por dia, durante quatro semanas.
- **Estibogluconato de sódio (Pentostam®)**: A monoterapia com este fármaco é administrada por via subcutânea ou intravenosa com as doses de 30-50 mg/kg uma vez por dia, durante três ou quatro semanas.

#### **1.1.2.6.1.2 Miltefosina (Milteforan®)**:

A monoterapia com este fármaco ou a associação do mesmo com outros, está gradualmente a substituir os compostos antimoniais como primeira escolha na terapêutica de Leishmaniose nos países do sul da Europa [69]. Este foi inicialmente desenvolvido como fármaco anti tumoral usado para a terapêutica tópica de metástases de pele em tumores mamários, mas demonstrou também possuir uma atividade anti-leishmanial forte contra LV humana. A sua forma de comercialização como produto veterinário está disponível para administração oral.

O seu princípio ativo (Hexadecilfosfolina) consiste num composto alquilfosfolípido semelhante às lecitinas. Pode ser clivada em colina nos hepatócitos pela fosfolipase C e D em todas as espécies. Esses produtos de degradação podem ser utilizados na síntese de acetilcolina ou lecitina no hospedeiro [70].

O seu mecanismo de ação ainda não está totalmente definido, mas estudos *in vitro* demonstraram que interfere com o metabolismo de ácidos gordos e esteróis das formas amastigostas, alterando a composição e fluidez da membrana plasmática do parasita. Também se sabe que induz o mecanismo de apoptose e promove a disfunção mitocondrial. Além destas funções, está provado que promove a resposta de linfócitos T helper (Th1) em cães, o que resulta num aumento de IFN- $\gamma$  no sangue, e por sua vez estimula a produção de radicais de oxigénio reativos e síntese de NO por parte dos macrófagos [69].

De forma semelhante ao que acontece nos humanos, a miltefosina demonstrou ter uma absorção lenta após administração *per os* e uma biodisponibilidade estimada de 94% nos cães. Além disso, estima-se que tenha uma meia-vida de 159 horas, o que proporciona uma acumulação no sangue cinco ou seis vezes superior em administrações repetidas [71]. Esta meia-vida longa, pode ser um fator que contribui para o desenvolvimento de resistências através da seleção de espécies resistentes e por isso a sua utilização deve ser ponderada com cuidado [72].

Está provado que a utilização deste fármaco não provoca efeitos nefrotóxicos, pelo que está recomendado para terapêutica de doentes renais, substituição de compostos antimoniais quando estes não são eficazes na terapêutica ou recaídas [73].

Um estudo realizado por Mateo *et al.*, permitiu que se verificasse a ocorrência de outros sinais clínicos ligeiros a moderados tais como dor intestinal, vômitos, diarreia e anorexia. [74] Outros estudos, demonstraram que este pode ter efeitos teratogénicos e provocar fetotoxicidade tanto em humanos como outros animais (roedores e outros), e por isso deve ser evitado em gestantes [71].

A dose recomendada de miltefosina como monoterapia é 2,0 mg/Kg por dia durante 30 dias [61].

#### **1.1.2.6.1.3 Alopurinol (Zyloric®):**

Este pode ser administrado de forma isolada (monoterapia) ou em associação com outros (potenciando o efeito leishmanicida), para a terapêutica de Lcan, e a sua utilização é muito comum na Europa. A forma mais comum de utilização na prática clínica é em combinação com compostos antimoniais, sendo considerada como *Gold standard* devido aos resultados positivos obtidos em diversos estudos (melhoria significativa de sinais clínicos e bom prognóstico) [75]. Neste caso, as doses utilizadas em estudos clínicos foram de 20-40 mg/kg por dia para o Antimoniato de meglumina e de 100 mg/kg por dia (durante 3 semanas) para o Alopurinol, por via intramuscular.

A sua composição química inclui um análogo da hipoxantina que é metabolizado pelo parasita num nucleótido trifosfato amino-pirazol-pirimidina, o qual é parte integrante da síntese de proteínas inibidoras do ARN da *Leishmania spp.* [76].

Está provado que a sua utilização não danifica o fígado ou glomérulos renais e contribui para a redução de proteinúria. Apesar de não estar documentada qualquer nefrotoxicidade, verificou-se a presença de cristais de xantina (e ocasionalmente urólitos) em quase todos os cães tratados, o que pode levar a azotémia pós-renal e ocasionalmente disfunção renal [77]. Esta presença de cristais pode ser observada na Figura 9.

Apesar de não ser considerada como primeira opção, a combinação de Alopurinol com Miltefosina tem surgido com mais frequência por ser pertinente devido à sua baixa toxicidade e aumento de casos de resistência aos compostos antimoniais [75]. Alguns ensaios clínicos demonstraram que se obtiveram resultados semelhantes à combinação *Gold standard*, utilizando as doses de 10 mg/kg por dia de Alopurinol e 2 mg/kg por dia de Miltefosina, durante 30 dias. Após esta terapia inicial, procedeu-se à continuação de terapêutica com Alopurinol durante os 12 meses seguintes [78].

A dose de Alopurinol usada como monoterapia varia entre 15-30mg/kg por dia *per os*, dividida em duas ou três tomas diárias. A duração da terapêutica varia e ajusta-se conforme a evolução

dos sinais clínicos, mas de forma geral obtêm-se bons resultados após longos períodos de tempo (entre quatro e dez semanas). [79]

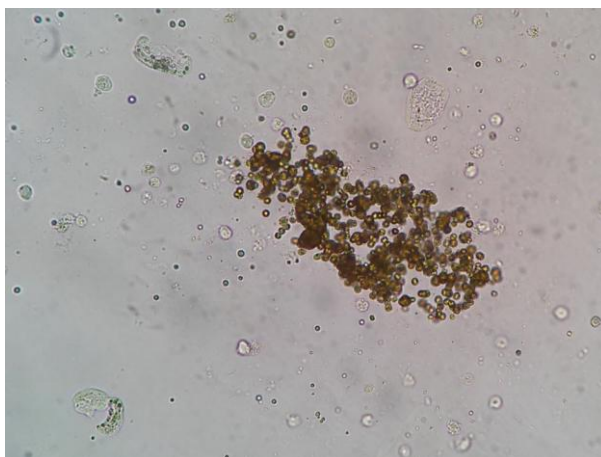


Figura 9 – Uratos com cristais de xantina (castanhos) em exame de sedimento urinário. Ampliação 400x. Fotografia gentilmente cedida por laboratório veterinário INNO.

#### **1.1.2.6.1.4 Domperidona:**

A utilização deste fármaco (de administração *per os*) na terapêutica e prevenção de Leishmaniose canina é recente, sendo utilizada anteriormente como antiemético para humanos que foram submetidos a quimioterapia, que possuíam refluxo esofágico e como procinético em gastroparêse diabética [69]. Esta aumenta a atividade da prolactina como recetor antagonista D2, o que além de promover a produção de leite, também pode estimular a libertação de prolactina pela hipófise. Por sua vez, esta libertação possibilita a ativação da resposta imune de Th1 e IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 e libertação de TNF- $\alpha$  [80].

É frequentemente utilizada para prevenção, pois esta induz a ativação de fagócitos que persistem pelo menos por um mês após a sua utilização. Também pode ser utilizada como medicação em estádios iniciais da doença, para auxiliar na remissão dos sinais clínicos e diminuição dos títulos de Ac [81].

Não são conhecidos efeitos nefrotóxicos após a terapêutica, apenas se tem conhecimento de alguns efeitos adversos digestivos (dor abdominal, diarreia e perda de apetite), que desaparecem quando a terapêutica é descontinuado. Também são conhecidas raras alterações nas glândulas mamárias (hiperplasia mamária e aumento da produção de leite).

As doses utilizadas para prevenção de Lcan são 0,5 mg/Kg por dia, durante pelo menos quatro semanas [81].

#### **1.1.2.6.1.5 Aminosidina:**

Este pertence ao grupo dos antibióticos aminoglicosídeos que são utilizados frequentemente na terapêutica de Lcan, em associação com Miltefosina. No caso dos humanos, constitui uma opção segura, relativamente barata e eficaz [82].

O seu modo de ação baseia-se na inibição da síntese de proteínas atingindo as proteínas ribossomais no parasita. Além de ter atividade anti-Leishmania, também promove um melhoramento do sistema imunitário do hospedeiro [83].

A concentração máxima do plasma é atingida uma hora depois de ter sido administrada por via parenteral, e em conjunto com Antimoniato de meglumina atrasa a eliminação por um mecanismo que promove a alteração da permeabilidade da membrana celular [84].

O seu principal efeito na redução de sinais clínicos manifesta-se pela diminuição da linfadenopatia. Também ajuda na normalização de alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos que possam estar alterados.

Por sua vez, é considerada muito nefrotóxica para cães e portanto está desaconselhada em casos de danos renais ou com sinais clínicos como proteinúria e urémia [85].

A dose recomendada é entre 15-20 mg/kg por dia, via intramuscular durante três semanas [86].

#### **1.1.2.6.1.6 Anfotericina B:**

Este é considerado um agente antifúngico macrocíclico de largo espectro com atividade anti-*Leishmania*. O seu mecanismo de ação consiste na formação de poros aquosos nas membranas celulares dos parasitas, através da sua ligação ao ergosterol e em seguida ao colesterol. Em seguida ocorre a alteração da permeabilidade (permitindo a passagem de cátions e aniões), causando distúrbios metabólicos e lise celular [87].

A via de administração utilizada é a parenteral, uma vez que existe má absorção no trato intestinal (via *per os*) e em vários estudos foram registados vômitos e anorexia em cerca de 80% dos casos [88].

Alguns estudos demonstraram que os cães tratados com este fármaco apresentaram uma melhoria rápida dos sinais clínicos, semelhante à que ocorre quando se utilizam Compostos antimoniais [89]. Por oposição, outros estudos demonstraram que este proporciona várias recidivas e uma necessidade de monitorizar a função renal durante a terapêutica, não providenciando evidência suficiente para a recomendação da administração deste fármaco a cães [88]. Estes efeitos secundários indesejáveis e a preocupação de possíveis resistências em humanos, induziram à proibição da utilização deste fármaco para uso veterinário em áreas endémicas de Leishmaniose por parte da WHO (World Health Organization).

#### **1.1.2.6.1.7 Marbofloxacin:**

Este é considerado um antibiótico de largo espectro que pertence ao grupo das fluoroquinolonas sintéticas de terceira geração, e é utilizado em medicina veterinária. [90] Estes são considerados potentes e específicos contra enzimas girases de ADN bacteriano (principalmente Gram negativos), aos quais se ligam por ligações covalentes complexas e eliminam eficazmente. Além disso, induzem a produção de NO, IL-6 e TNF- $\alpha$  [69, 90].

Um ensaio clínico onde se utilizou este fármaco para terapêutica de Leishmaniose canina em 24 cães naturalmente infetados, permitiu concluir que com uma dose de 2 mg/Kg por dia durante 28 dias (*per os*), ocorreu uma remissão dos sinais clínicos (linfadenomegália, onicogrifose e esplenomegália) em cerca de 70% dos casos durante os três meses seguintes. [90] Outro estudo de seguimento destes animais um ano após a terapêutica com Marbofloxacin, concluiu que a remissão dos sinais clínicos se manteve, mas que os animais permaneceram positivos por análise de PCR e citologia de linfonodos [91].

#### **1.1.2.6.2 Terapia de Suporte**

Em alguns casos, quando a terapêutica convencional não tem efeito ou quando existem outras patologias concomitantes, é necessária a utilização de terapêutica de suporte ou outras alternativas.

Uma vez que o desenvolvimento de uma resposta imunitária competente é um fator crucial para a recuperação e remissão de sinais clínicos na Lcan, torna-se também importante a utilização de imunomoduladores. Destes, podem-se destacar o Levamizol, Prednisona, Prednisolona e Cimetidina, bem como as Citoquinas e o Interferão gamma (mais recentes). Apesar destes serem utilizados amplamente em humanos, o seu uso em cães ainda é limitado e requer a realização de mais estudos.

Além da terapêutica leishmanicida, por vezes é necessário uma terapia sintomática. Esta pode compreender o uso de fluidoterapia, antibióticos de largo espectro de ação, anti-inflamatórios, transfusões sanguíneas, dietas específicas e mais comumente a terapia para insuficiência renal (de acordo com os critérios da IRIS).

#### **1.1.2.7 Prevenção**

Tal como referido anteriormente, devido à sua patogénese complexa, às suas variadas formas clínicas e ao carácter zoonótico, torna-se necessário o desenvolvimento de meios profiláticos que possam atrasar o desenvolvimento da doença e reduzir a capacidade infetante e de transmissão. Para tal, existem duas formas de atuar: diretamente no hospedeiro ou no vetor.

#### 1.1.2.7.1 Vacinas

As vacinas são consideradas ferramentas essenciais na prevenção de uma doença, pois ajudam na estimulação da resposta imunitária do hospedeiro, de forma a que este possa ter mais uma linha de defesa contra os patógenos.

A vacina ideal é a que permite a prevenção do desenvolvimento de sinais clínicos, mesmo quando o animal já se encontra infectado. Desta forma iria proteger cães vacinados, e consequentemente provocaria uma redução da incidência da doença e das taxas de infeção em cães e humanos não vacinados.

Para ser eficaz, uma vacina deve induzir uma resposta imunitária do tipo Th1 que seja forte e tenha longa duração, e por isso nos últimos anos têm sido desenvolvidas três gerações de vacinas, baseados no tipo de antígeno: parasitas de *Leishmania* atenuados ou mortos; proteínas recombinantes purificadas de *Leishmania*; ou proteínas das glândulas salivares de flebotomos contendo o ADN de *Leishmania* [92].

Além dos tipos de antígenos, também os sistemas de inclusão do antígeno nas células do hospedeiro têm sido investigados. Destes, os métodos mais utilizados são: as lipossomas, nanomateriais e electroporação (na qual um campo magnético é aplicado às células, aumentando a permeabilidade celular) [92].

Relativamente à eficácia das vacinas no melhoramento dos sinais clínicos, esta varia entre os 57 e 80%. Em zonas endémicas, a exposição aos vetores pode durar até 8 meses e portanto a vacinação dos cães é recomendada em conjunto com repelentes inseticidas como forma preventiva. Nas áreas de transição (que se situam perto de zonas endémicas, mas que ainda não são consideradas dessa forma) devem-se tomar medidas semelhantes às das zonas endémicas, pois a doença pode se propagar através de cães, pessoas ou animais selvagens que se movimentem para esses locais. Em zonas indemnes, a ausência ou reduzido número de vetores e o baixo número de cães infectados não apresentam risco de transmissão, e por isso a vacinação não providencia benefícios significantes [92].

No caso de animais que viagem de zonas indemnes para zonas endémicas, a vacinação irá depender da duração da viagem durante a época de exposição ao vetor. Se a viagem for de curta duração (um mês), a prevenção deverá ser composta por repelentes inseticidas e a vacinação poderá ser opcional. Por outro lado, se a viagem for mais longa deverá ser feita uma prevenção adequada com uma combinação de repelentes inseticidas e vacinação [92].

Existem três tipos de vacinas: de primeira geração, de segunda geração e de terceira geração. As vacinas de primeira geração possuem como antígenos parasitas vivos atenuados, os quais são obtidos através de culturas *in vitro* em diferentes meios, através da sensibilidade à temperatura, radiação gama ou mutagenese química [93].

As vacinas de segunda geração surgiram com a observação de que a imunização com determinados antígenos parasitários providenciava proteção contra *L. infantum*. Estas incluem o antígeno inteiro de parasitas de cultura, as frações nativas purificadas dos parasitas



baseados nas proteínas de superfície ou antígenos recombinantes criados por engenharia genética. As vacinas que estão disponíveis atualmente no mercado são desta categoria [94].

As vacinas de terceira geração (ou vacinas de ADN) constituem a mais recente categoria das vacinas. Nestas, um antígeno estranho é introduzido no ADN de um plasmídeo bacteriano, o qual é modificado por engenharia genética de forma a se expressar nas células eucarióticas. Esta leva a uma produção forte de Ac bem como a respostas imuno-mediadas por células [95].

Por serem de difícil produção e por nenhuma apresentar uma proteção com 100% de eficácia, apenas três vacinas estão disponíveis no mercado veterinário: Leish-Tec® (América Latina), CaniLeish® (Europa) e Letifend® (Europa). Até dia 11 de Novembro de 2014 existia outra vacina (Leishmune®) que era comercializada na América Latina, mas esta foi removida do mercado por não apresentar os requisitos necessários nos estudos de fase 3, nos quais se provaria a sua eficácia [96]. Desta forma, as seguintes encontram-se disponíveis no mercado europeu:

- **CaniLeish®**: É comumente designada por LiESP/QA-21, pois é composta por proteínas excretadas de *L. infantum* (LiESP), com um adjuvante contendo uma fração purificada da saponina *Quilaja saponaria* (QA-21) [97].

Segundo um estudo realizado por Moreno *et al.*, no qual se administrou a LiESP/QA-21, verificou-se que esta permite um desenvolvimento da resposta imunitária com aumento dos níveis de IgG2 (que estão associados a uma resposta do tipo Th1) [97].

Um estudo anterior, realizado com uma vacina LiESP-MDP (adjuvante dipeptídeo muramyl) permitiu um estabelecimento de uma resposta celular imunitária do tipo Th1 em cães vacinados, com aumento de produção de IFN- $\gamma$  e IgG2 aos dois e oito meses após a vacinação. Também se verificou *in vitro*, que no soro de cães vacinados ocorria a inibição da infetividade das promastigotas dentro dos macrófagos. Esta alteração na percentagem de macrófagos infetados foi muito pronunciada, sugerindo que os anticorpos interferiram não só na multiplicação e sobrevivência intracelular dos parasitas, bem como na ligação e/ou fagocitose de promastigotas pelos macrófagos [98].

Dois anos após um estudo realizado em zonas onde predominavam flebotomos, verificou-se que a prevenção dos sinais clínicos foi cerca de 68,4% em cães vacinados com um nível de proteção de 92,7%. Neste, também se observou que nos animais onde se desenvolveram sinais clínicos, a sua progressão foi mais lenta e menos grave [99].

Atualmente sabe-se que a vacinação com LiESP/QA-21 além de ser capaz de estimular a resposta imunitária do tipo Th1, esta ainda se encontra presente um ano

após a última injeção da vacinação primária e sem administração do reforço anual [100, 101].

Podem se observar ocasionalmente reações locais moderadas após a vacinação, tais como: edema, formação de nódulos, dor à palpação e eritema. Estas reações normalmente resolvem-se espontaneamente entre dois dias e duas semanas. Mais raramente podem ser observadas hipertermia, apatia e desordens intestinais durante o primeiro e o sexto dia após a vacinação [99].

O protocolo recomendado de administração consiste numa vacinação primária de três doses com 21 dias de intervalo entre cada e um reforço anual. Esta deve ser complementada com a utilização de colares impregnados com inseticidas para diminuir a probabilidade de transmissão aos vetores [99].

- **LetiFend®:** Esta vacina é muito recente no mercado. É composta por um antígeno designado Proteína Q (QP), que consiste numa proteína recombinada que é formada pela fusão de 5 fragmentos antigénicos de proteínas intracelulares de *L. infantum*. Ao contrário de outras vacinas, esta não possui adjuvante [102].

Esta induz um aumento de anticorpos IgG2 anti-QP que atingem o seu pico 14 dias após a vacinação primária.

Além disso, a vacinação não interfere com a medição de títulos de anticorpos usados nos métodos de diagnóstico utilizados (IFI e várias marcas de kits comerciais de ELISA) [103].

Foi realizado um estudo de 24 meses em França e Espanha, com 549 cães seronegativos (cuja metade foi vacinada), para testar a eficácia desta vacina. Quando terminou, verificaram-se apenas oito casos de leishmaniose nos animais vacinados em contraste com 19 casos no grupo de controlo. Também se registaram poucos efeitos secundários, sendo o mais comum prurido no local de injeção (o qual se resolveu passado quatro horas) [102].

#### **1.1.2.7.2 Controlo de vetores**

O controlo de vetores constitui uma medida preventiva importante, pois diminui a hipótese de transmissão de Lcan. Uma vez que quase nunca se conhece a localização dos locais de criação dos flebótomos, as medidas que se aplicam são direcionadas aos adultos e não aos estádios larvares [104].

A forma mais fácil de prevenção é sugerir aos tutores dos animais que os mantenham dentro de casa desde o anoitecer até de manhã (se possível), e que cubram as janelas e orifícios com redes mosquiteiras de forma a que os flebótomos não entrem nas habitações.

A pulverização de inseticidas no ar apesar de eficaz possui um efeito transitório e é por isso uma medida considerada insustentável durante longos períodos. Em áreas vastas onde a

Lcan é endêmica, o controlo ambiental pode ser inacessível economicamente. Além da área geográfica, o comportamento e ecologia dos vetores pode influenciar o método preventivo escolhido.

A aplicação de inseticidas nas paredes, tetos de casas e abrigos de animais (capoeiras, currais, etc.) demonstrou ser eficaz na redução da população de flebótomos. Os microhabitats favoráveis ao desenvolvimento dos vetores (solos húmidos em áreas de sombra e fendas nas paredes das habitações) também devem de ser removidos se possível, de forma a minimizar o risco. A instalação de armadilhas eletrocutoras com lâmpadas ultravioleta para atrair os insetos no exterior desses abrigos e algumas habitações também pode ser uma medida preventiva.

Apesar de não possuir um efeito tão marcado como alguns inseticidas sintéticos, a plantação de algumas plantas com efeito repelente ou inseticida (Por exemplo eucalipto, citronela, entre outras) sobre alguns insetos pode ser considerada um método de prevenção [105-108].

O uso de organoclorados e outros grupos químicos gera cada vez mais preocupação pela sua implicação na saúde pública e o ambiente, o que tem levado a uma substituição progressiva destes compostos por piretróides sintéticos (por exemplo, cipermetrina, deltametrina, etc.). Os piretróides também podem ser utilizados em cães, constituindo uma medida preventiva muito eficaz, na qual os insetos experimentam desorientação e abandonam o hospedeiro sem se alimentarem (sem picada), prevenindo também assim a infeção. Estes estão disponíveis na forma de *spot-on* ou colares impregnados e possuem uma duração de 1 até 8 meses, respetivamente. Quando se aplica um *spot-on*, deve se ter em conta que este só se distribui uniformemente na pele após 24 horas e que este deve ser utilizado cerca de um mês antes da época de maior atividade dos vetores, de forma a atingir o nível de proteção máximo. [109]

O efeito inseticida da deltametrina e permetrina, de forma isolada ou em associação com outros inseticidas foi testado diversas vezes contra diferentes vetores. Este foi avaliado através da captura de flebótomos fêmeas logo após o contacto com animais tratados. Os resultados desses estudos foram positivos, nos quais cerca de 84 a 96% dos flebótomos não se alimentaram dos cães e cujo o efeito inseticida chegou perto dos 100% nas poucas fêmeas que se alimentaram. Outros estudos comparativos entre colares contendo 4% de deltametrina (Scalibor®) ou 10% de imidacloprida e 4,5% de flumetrina, e um *spot-on* contendo 10% de imidacloprida e 50% de permetrina (Advantix®), demonstraram taxas de proteção entre 50 e 100%. [104]

## **2. Objetivos:**

Os objetivos deste estudo consistiram na caracterização da população e de algumas das suas alterações clínicas e laboratoriais, bem como a procura de padrões que possam ser significativos para o prognóstico da doença. Desta forma, os objetivos gerais foram:

- Caracterizar a população em relação a: sexo, idade, raça, distrito, número de serologias realizadas e análises laboratoriais realizadas.
- Identificar quais foram os animais considerados positivos no diagnóstico de Lcan, através de uma seleção a partir de todos os resultados de serologia *ELISA*, de acordo com os critérios do laboratório de referência.
- Verificar a existência de uma correlação entre a variável sexo (feminino e masculino) e a variável diagnóstico (animais positivos e negativos).
- Observar em quantos casos foram realizadas análises bioquímicas específicas para os parâmetros renais (creatinina) e hepáticos (ALT), uma vez que estes se encontram alterados com frequência (elevados) em animais com Lcan.
- Observar em quantos casos foram realizados proteinogramas e se os seus parâmetros se encontravam alterados (Proteínas totais, Globulinas beta, Globulinas gama e Rácio Albumina/Globulina), visto que é comum estes se encontrarem elevados em animais com Lcan.
- Identificar em que mês foi feito o diagnóstico, uma vez que a Lcan é uma doença perpetuada por vetores que estão dependentes da sazonalidade.
- Caracterizar a amostra constituída pelos animais positivos em relação a: sinais clínicos que apresentaram no momento de diagnóstico, métodos de diagnóstico utilizados e planos de terapêutica aplicados.
- Verificar quais foram os planos terapêuticos aplicados em cada caso considerado como positivo no diagnóstico.

Por sua vez, o objetivo final (e principal) consistiu em reunir os animais em grupos consoante os diferentes protocolos terapêuticos (isolados ou associações de fármacos) e compará-los em relação à eficácia de cada um. Esta comparação foi realizada através da observação das diferenças entre as médias dos resultados serológicos (feitos com testes de *ELISA*) ao diagnóstico (T0) e após o início da terapêutica (T1).

## **3. Materiais e métodos**

### **3.1 Amostra:**

A população deste estudo foi composta por 251 cães, provenientes de vários distritos de Portugal Continental, que efetuaram análises no laboratório veterinário INNO. Os critérios de seleção de cada um foram os seguintes:

- A realização de duas ou mais serologias *ELISA*.

- A última colheita tenha sido realizada durante o período de tempo compreendido entre 31 de Dezembro de 2015 e 17 de Novembro de 2016.

Deste total, 170 cães foram considerados como positivos no diagnóstico de Lcan, segundo os critérios do laboratório de referência. Após essa seleção, foram submetidos inquéritos aos CAMVs que tinham enviado as suas amostras para análise, e obtiveram-se 98 respostas (dos 170 inquéritos enviados).

### 3.1.1 Tipo de estudo

Por se basear em dados de fichas clínicas e ser necessária a obtenção de dados adicionais através de inquéritos, este estudo foi considerado observacional transversal e retrospectivo. Desta forma, decidiu-se dividir o estudo em três partes distintas:

1. Na primeira parte do estudo foi feita a caracterização da população, cuja informação se encontrava disponível na base de dados do laboratório veterinário INNO, sendo recolhidos dados relativos a: sexo, idade, raça, distrito, número de serologias realizadas e análises laboratoriais realizadas.
  - a. As análises laboratoriais realizadas compreenderam os seguintes parâmetros: Creatinina, Alanina Aminotransferase, Proteínas Totais, Rácio Albumina/Globulinas, Globulinas Beta e Globulinas Gama.

Os valores de referência considerados para estes parâmetros foram os do laboratório de referência e encontram-se resumidos na Tabela 4.

Após esta caracterização inicial, seleccionaram-se os resultados que corresponderam a animais positivos no diagnóstico de Lcan (segundo os critérios do laboratório) e aplicou-se também uma análise estatística dirigida a estes resultados.

Tabela 4 – Valores de referência dos parâmetros seleccionados, consoante o laboratório de referência

Parâmetros	Valores de referência	Unidades
<b>Creatinina</b>	0.5 - 1.7	mg/dL
<b>Alanina aminotransferase</b>	10.0 – 109.0	U/L
<b>Proteínas Totais</b>	5.4 - 7.5	g/dL
<b>Rácio Albumina/Globulina</b>	0.6 – 1.1	-
<b>Globulinas Beta</b>	0.6 - 1.2	g/dL
<b>Globulinas Gama</b>	0.5 – 1.8	g/dL

2. Na segunda parte do estudo, foram contactadas as entidades que enviaram as amostras dos casos considerados positivos para análise. Após a sua permissão, foram submetidos inquéritos às mesmas (relativos às amostras enviadas) sobre

algumas das informações clínicas: sinais clínicos presentes no momento de diagnóstico, métodos de diagnóstico utilizados além da serologia *ELISA* e planos de terapêutica aplicados.

3. Na última parte do estudo, cruzaram-se os resultados de análises serológicas no momento do diagnóstico (T0) e os resultados da primeira serologia após o início da terapêutica (T1), com os dados obtidos nos inquéritos relativamente ao protocolo terapêutico de cada animal.

### **3.2 Colheita, receção e conservação das amostras**

A colheita de sangue foi realizada nos respetivos CAMVs, para tubos secos ou tubos secos com gel com 3 a 5ml de volume, e estes foram posteriormente enviados para o laboratório.

No laboratório, as amostras sanguíneas foram recebidas diariamente através do serviço de transportadoras (CTT ou MRW) e/ou reunidas pelos estafetas dos carros de recolha. O serviço de transportadoras entregou as amostras provenientes de vários CAMVs de todo o país, de 2ª a sábado por volta das 9h. Por sua vez, os estafetas do laboratório deslocaram-se de 2ª a 6ª feira aos CAMVs mais próximos para recolher as amostras, e regressaram posteriormente ao laboratório onde fizeram as entregas nos horários estabelecidos (entre as 12h e 13h30 e entre as 18h e 19h).

Após a receção, as amostras foram registadas no sistema informático do laboratório (CLINIDATA) e foram processadas. O processamento incluiu a sua centrifugação a 3000rpm durante 10 minutos para obtenção do soro, na centrífugadora KUBOTA 5400®. Em seguida, realizou-se a separação do soro para *ependorfs* ou tubos secos, os quais foram refrigerados a quatro graus *Celsius* até à realização das análises referidas (serologia *ELISA*, proteinograma e análises bioquímicas dos parâmetros selecionados).

### **3.3 Realização da pesquisa de Ac anti-*Leishmania*, através da técnica de *ELISA***

A técnica de pesquisa de Ac anti-*Leishmania* foi realizada sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Paula Brilhante Simões e das Sras. Técnicas de laboratório. Para tal, utilizou-se o *kit* LEISCAN® LEISHMANIA *ELISA* TEST, fabricado pelos LABORATORIOS HIPRA, S.A. e gentilmente cedido pela ESTEVE FARMA (Figura 10). A técnica foi executada de acordo com as instruções do fabricante:

1. Preparações prévias:
  - a. Colocar todos os reagentes à temperatura ambiente, dez minutos antes de proceder à realização da técnica.

- b. Preparar a “Solução de lavagem”: Diluir 1 volume da solução de lavagem (frasco nº 0) em 19 volumes de água destilada. Se a lavagem for manual, são necessários 4 ml de solução de lavagem diluída por cada poço a utilizar. A solução reconstituída pode armazenar-se durante quatro semanas entre 2-8 °C.

2. Preparação das amostras:

- a. Diluir a 1:20 as amostras com o Diluente de Amostras (frasco nº 1), misturando dez µL de amostra com 190 µL de Solução Diluente de Amostras. Os controlos (positivo alto, positivo baixo e negativo) são fornecidos diluídos, prontos a utilizar.
- b. Retirar a película protetora que cobre os poços apenas quando estes vão ser utilizados. Colocar 100 µL da amostra diluída ou controlo em cada poço. Agitar suavemente durante 15 segundos. É recomendado no mínimo um controlo por cada coluna da placa para verificar a validade dos resultados.
- c. Incubar dez minutos à temperatura ambiente (20-25°C).
- d. Descartar o conteúdo dos poços e lavar 5 vezes cada poço com 300 µl de solução de lavagem diluída.
- e. Juntar 100 µL de conjugado (frasco nº 2) a cada poço. Agitar suavemente durante 15 segundos.
- f. Incubar cinco minutos à temperatura ambiente (20-25 °C).
- g. Repetir o passo d).
- h. Juntar 100 µL de Substrato (frasco nº 3) a cada poço. Agitar suavemente durante dez segundos.
- i. Incubar dez minutos no escuro à temperatura ambiente (20-25 °C).
- j. Juntar 100 µL de Solução *STOP* (frasco nº 4) a cada poço.
- k. Ler as densidades óticas num leitor *ELISA* com um filtro de 450 nm. No presente caso, no espectrofotómetro da marca MINDRAY® , modelo MR-96A.
- l. Calcular os resultados:

$$\text{Razão da amostra (Rz)} = \frac{\text{Densidade ótica da amostra}}{\text{D. ótica do controlo positivo baixo}}$$

- m. Interpretar os resultados. (Tabela 5)



Figura 10 - Kit Leiscan® *Leishmania* ELISA test, Esteve Farma. [110]

Tabela 5 – Interpretação dos resultados do kit *Leiscan® Leishmania* ELISA test, de acordo com o fabricante.

Razão (Rz) da amostra	Resultado
Razão da amostra < 0,5	Negativo
0,5 < Rz < 0,7	Negativo
0,7 < Rz < 0,9	Negativo
0,9 < Rz < 1,1	Duvidoso
1,1 < Rz < 1,5	Positivo Baixo
1,5 < Rz	Positivo

### 3.4 Realização de análises bioquímicas aos parâmetros selecionados

Após a receção e processamento (centrifugação e separação do soro) das amostras, estas foram colocadas num aparelho automático de espectrofotometria de absorvância (da marca Mindray BS-380®). Quando não foi possível realizar as análises referidas logo após o processamento, as amostras foram refrigeradas a quatro graus Celsius até ao momento da sua realização.

A técnica referida (espectrofotometria de absorvância) consistiu em: [111]

- Passagem de um feixe de luz (com um determinado comprimento de onda) na direção do tubo onde se encontra a amostra a analisar.
- Medição da absorvância (quantidade de luz absorvida) e determinação da concentração da amostra.
- Junção de um substrato da enzima (presente num reagente específico para o parâmetro a analisar) à amostra, numa cuvete do aparelho.
- Conversão do substrato em produto (por parte das enzimas da amostra) e medição da sua absorvância. Esta medição teve o objetivo de controlar a taxa de formação do produto e de contabilizar a atividade enzimática.



### **3.5 Realização de proteinogramas**

As amostras que se destinaram à realização de proteinogramas foram refrigeradas a quatro graus Celsius e posteriormente enviadas para um laboratório parceiro, onde foram processadas através da técnica de eletroforese. Os resultados das amostras enviadas, foram mais tarde recebidos no laboratório INNO e reenviados para os respetivos CAMVs.

### **3.6 Seleção de animais positivos e envio de inquéritos:**

A partir da população inicial (251 cães), procedeu-se à seleção dos animais positivos no diagnóstico de Lcan, através dos critérios do laboratório INNO. Segundo estes critérios, todos os resultados de serologia *ELISA* que apresentaram valores superiores à razão de 1,1 (Rz) foram considerados positivos no diagnóstico de Lcan. Desta forma, consideraram-se 170 animais como positivos.

Após a seleção, contactaram-se telefonicamente os CAMVs que tinham enviado as amostras de casos positivos, sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Paula Brilhante Simões, Dr. Augusto Silva e Dr. Ricardo Lopes. Os contactos estabelecidos tiveram como objetivo o pedido de permissão da utilização de dados na realização deste estudo e do envio de um inquérito relativo à história clínica (sinais clínicos no momento do diagnóstico, métodos de diagnóstico utilizados e planos de terapêutica aplicados) de cada animal. Os inquéritos foram enviados por email e o modelo geral dos mesmos pode ser visualizado no Anexo 1.

Dos 170 inquéritos enviados, obtiveram-se 98 respostas, correspondentes a 98 animais.

### **3.7 Análise estatística:**

Os dados foram inicialmente introduzidos numa folha de cálculo do Microsoft Office Excel ® 2007 e posteriormente importados para o programa IBM SPSS Statistics 24.0 para Windows® onde foram trabalhados.

Foi realizada uma análise estatística com base em métodos descritivos (caracterização e sumarização dos dados em proporções e tendências) e inferenciais (estimação de parâmetros da população e testes de hipóteses).

A análise estatística compreendeu as seguintes ações:

1. Medição de frequências relativas (percentagens) do parâmetro “sexo”.
2. Aplicação do método de Sturges para o cálculo das classes do parâmetro “idade”, medição das frequências relativas e representação gráfica das mesmas.
  - a. Utilizou-se este método pois a idade constitui uma variável de natureza contínua, e a mesma deve ser agrupada em classes para se fazer uma distribuição e caracterização mais correta.

- b. As classes calculadas e definidas para o parâmetro “idade” foram: de um a três anos, de quatro a seis anos, de sete a nove anos, de dez a doze anos, de treze a quinze anos e a partir de dezasseis anos.
3. Medição de frequências relativas do parâmetro “raça”.
4. Medição de frequências relativas e representação gráfica do parâmetro “distrito”.
5. Medição de frequências relativas do parâmetro “número de serologias realizadas” e cálculo de medidas de dispersão associadas ao mesmo (média e desvio padrão).
6. Realização do teste de hipóteses do Qui-quadrado, para comparação de variáveis nominais: “sexo” e “diagnóstico”, considerando-se uma probabilidade de erro do tipo I ( $\alpha$ ) de 0.05 em todas as análises inferenciais.
  - a. A utilização deste teste tem o objetivo de comparar duas variáveis nominais (sexo e diagnóstico), que constituem dados sem ordem ou categorias significativas, de forma a testar a sua independência (verificando a associação entre as duas).
  - b. Neste teste as hipóteses em estudo são:
    - $H_0$  (hipótese nula): as variáveis são independentes, ou seja, não existe associação entre as variáveis;
    - $H_1$  (hipótese alternativa): as variáveis não são independentes.
  - c. Após a aplicação deste teste no *software* IBM SPSS 24.0, obtêm-se duas tabelas, sendo a primeira um resumo das contagens e percentagens relativas, e a segunda sobre o teste estatístico em si.
  - d. Para se considerar o teste válido, observa-se a alínea a. da tabela do teste estatístico. Nesta alínea verifica-se se a percentagem da contagem das células menores que 5 é superior a 20% e se a contagem mínima esperada é inferior a 1. Quando se verifica este acontecimento, significa que as suposições deste teste estão violadas e o mesmo não é válido.
  - e. Na tabela do teste estatístico, observam-se geralmente os dados obtidos na linha do Qui-quadrado de Pearson. No entanto, no caso das tabelas de 2x2, observam-se os dados apresentados na linha da Correção de continuidade.
  - f. Por fim, observa-se a significância assintótica (p) e se esta for inferior ao valor  $\alpha$  (que se assumiu como 0,05 na realização deste teste), rejeita-se a hipótese nula ( $H_0$ ) e conclui-se que as variáveis possuem uma correlação entre elas.
7. Medição de frequências relativas, cálculo de medidas de localização central (média), localização relativa (mínimo e máximo) e medidas de dispersão (desvio padrão), e representação gráfica dos parâmetros: Creatinina, Alanina Aminotransferase, Proteínas Totais, Rácio Albumina/Globulina, Proteínas Beta e Proteínas Gama.

8. Medição de frequências relativas e representação gráfica do parâmetro “mês de diagnóstico”.
9. Medição de frequências relativas do parâmetro “Sinais clínicos” e “Outros”.
10. Medição de frequências relativas do parâmetro “Métodos de diagnóstico”.
11. Medição de frequências relativas do parâmetro “Protocolos terapêuticos aplicados”.
12. Aplicação de um teste de Normalidade aos dados em cada grupo terapêutico, de forma a ser possível relacionar as médias dos títulos de Anticorpos em T0 e T1, e no qual se assumiu  $\alpha = 0,05$ .
  - a. Quando as amostras são reduzidas (inferiores a 30), realiza-se um teste de Shapiro-Wilk.
  - b. Neste teste, para uma dada variável em estudo as hipóteses a testar são:
    - H0: os dados provêm de uma distribuição normal
    - H1: os dados não são provenientes de uma distribuição normal.
  - c. A decisão é tomada com base no valor-p obtido para o teste.
  - d. No caso do valor-p (significância)  $\leq \alpha$  escolhido para o teste, então rejeita-se H0 e não se pode considerar a normalidade da variável em estudo. Por sua vez, se valor-p  $> \alpha$ , não se rejeita a H0 e assume-se que os dados provêm de uma distribuição Normal.
13. Representação gráfica das médias dos grupos de terapêutica em T0 e T1, e cálculo de medidas de localização (média, mínimo, máximo e percentis).
14. Realização de Testes de t-Student para dados emparelhados, de forma a comparar as médias de T0 e T1 nos diferentes grupos de terapêutica, com um intervalo de confiança de 95% e um  $\alpha = 0,05$ .
  - a. Este teste consiste numa medição de um grupo de casos em que se comparam os mesmos parâmetros (títulos de Ac) em duas alturas diferentes (ao diagnóstico antes de iniciar a terapêutica, e após iniciar a terapêutica).
  - b. Neste teste, as hipóteses em estudo são:
    - H0: as médias de T0 e T1 são iguais.
    - H1: as médias de T0 e T1 são diferentes.
  - c. No caso do valor-p  $\leq \alpha$  escolhido para o teste, então rejeita-se H0 conclui-se que as médias de T0 e T1 são diferentes. Por sua vez, se valor-p  $> \alpha$ , não se rejeita a H0 e assume-se que as médias de T0 e T1 são iguais.

#### 4. Resultados:

##### 4.1 Caracterização da população:

Foram incluídos na população deste estudo 251 animais, dos quais 145 eram machos ( $n=145/251$ ; 57,8%) e os restantes 106 eram fêmeas ( $n=106/251$ ; 42,2%), como se pode observar no Gráfico 1.

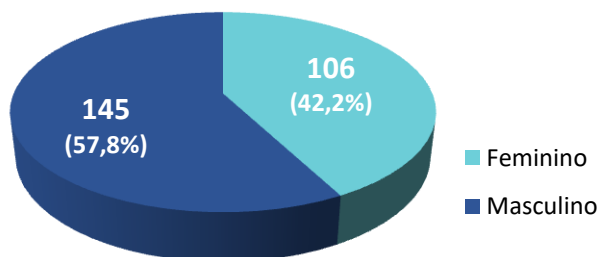


Gráfico 1 – Frequência relativa (%) da distribuição de animais por sexo.

A idade dos animais variou entre um e dezasseis anos, com uma média de 6,26 e um desvio padrão de 3,53 (Gráfico 2). Verificou-se que as classes com mais casos foram a faixa etária de um a três anos (66 animais, 26,3%) e a faixa etária de sete a nove anos (62 animais, 24,7%). Também se observou que a classe com menor número de casos foi a faixa etária a partir dos 16 anos (1 animal, 0,40%).

Por sua vez, em 23 casos não existia informação sobre a idade dos animais correspondentes ( $n=23/251$ ; 9,2%).

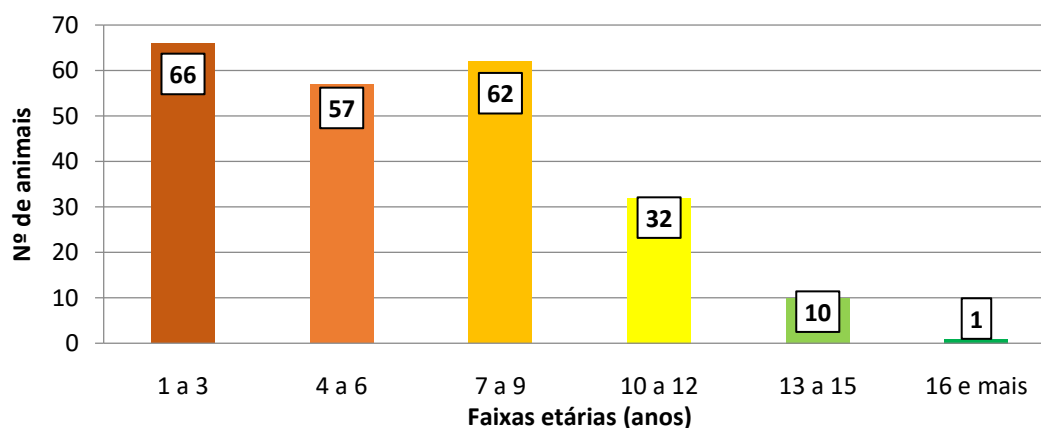


Gráfico 2 – Distribuição dos animais por faixa etária (anos).

Relativamente aos animais correspondentes a cada raça (Tabela 6), observámos que a maioria correspondeu a animais sem raça definida (86 animais, 34,3%). Também se observou um número considerável de animais pertencentes às raças Labrador (46 animais, 18,3%), Pastor alemão (15 animais, 6,0%) e Boxer (11 animais, 4,4%).

Nas restantes raças observou a seguinte distribuição: oito animais da raça *Golden retriever*; sete das raças Caniche, *Husky siberiano* e *Jack Russel Terrier*; cinco das raças *Pitbull* e São

bernardo; três das raças Braco alemão, *Bulldog Francês*, Cão de gado transmontano, *Epagneul breton*, Rafeiro alentejano e *Rottweiler*; dois das raças *Beagle*, *Border collie*, *Chow-chow*, *Dogue alemão*, Podengo, *Samoiedo*, *Setter* e *Teckel*. Além das raças referidas, a criou-se a categoria “Outra” a qual foi constituída por outras raças que só possuíam um animal de cada na população. Estas raças foram: *Rough Collie*, *Yorkshire*, *Grand Danois*, Dálmata, *Cocker Americano*, *Fox Terrier*, Pastor Belga, *Dogue Argentino*, entre outras.

Tabela 6– Frequência relativa (%) da distribuição de cães por raça.

Raças	Frequência absoluta	Percentagem (%)
Beagle	2	0,8
Border Collie	2	0,8
Boxer	11	4,4
Braco Alemão	3	1,2
Bulldog Francês	3	1,2
Caniche	7	2,8
Cão de Gado Transmontano	3	1,2
Chow-chow	2	0,8
Dogue Alemão	2	0,8
Epagneul Breton	3	1,2
Golden Retriever	8	3,2
Husky Siberiano	7	2,8
Jack Russel Terrier	7	2,8
Labrador	46	18,3
Pastor Alemão	15	6,0
Pitbull	5	2,0
Podengo	2	0,8
Rafeiro Alentejano	3	1,2
Rottweiler	3	1,2
Samoiedo	2	0,8
São Bernardo	5	2,0
Setter	2	0,8
Teckel	2	0,8
Sem raça definida	86	34,3
Outra	20	8,0
Total	251	100

Em relação aos CAMVs de onde provieram as amostras, a sua distribuição pode ser observada na Figura 11.

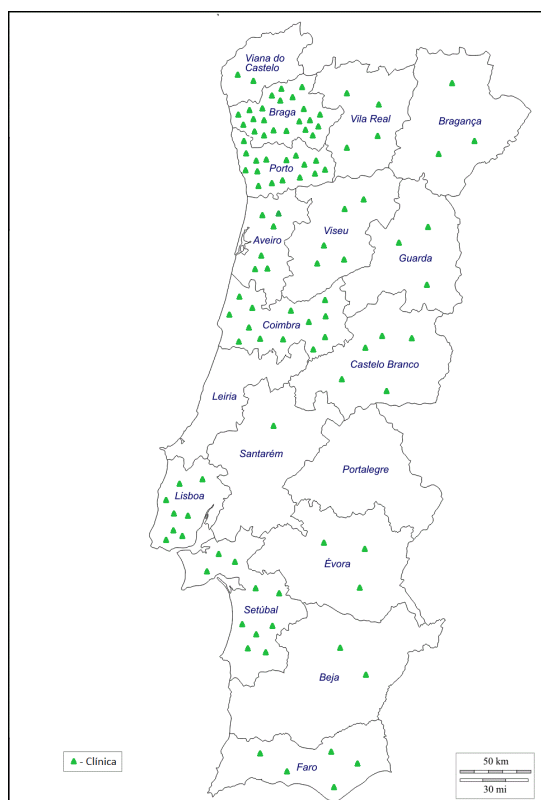


Figura 11 – Mapa de Portugal com distribuição de CAMVs por distrito.

Dos distritos de onde provieram as amostras (Gráfico 3), observou-se que foi Coimbra (40 amostras, 15,9%) que teve maior número. Também se verificou um número elevado de amostras provenientes de Braga e Setúbal (13,9% e 11,2%, respetivamente). Por sua vez, o distrito de onde derivaram menos amostras, foi Santarém com apenas uma (0,4%).

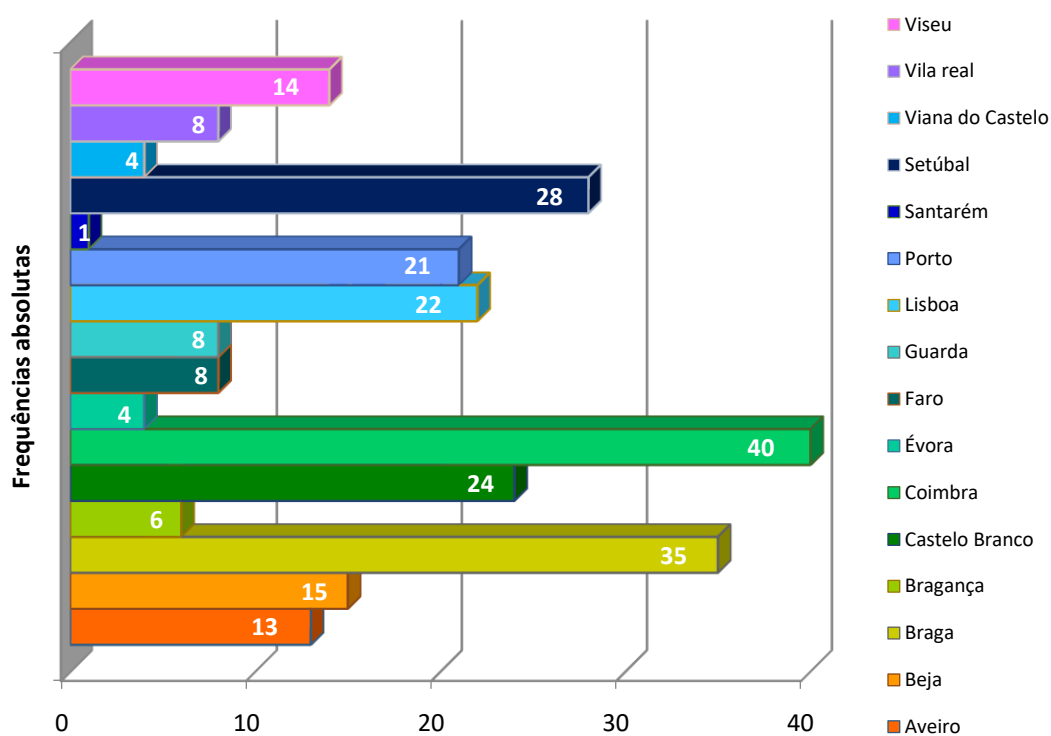


Gráfico 3 – Frequências absolutas da distribuição de amostras por distritos.

O número de serologias realizadas por cada animal (Tabela 7) variou entre as duas (mínimo) e as nove (máximo). A maioria dos animais (169) realizou duas serologias (67,3%), e somente cerca de 5% dos animais (13) realizou 5 ou mais serologias.

Tabela 7 – Distribuição de cães por nº de serologias realizadas.

Nº de serologias	Frequência	Percentagem (%)
2	169	67,3
3	46	18,3
4	23	9,2
5	8	3,2
6	3	1,2
9	2	0,8
<b>Total</b>	<b>251</b>	<b>100</b>

Da população de 251 animais, 170 foram considerados positivos ( $n=170/251$ ; 67,7%) e os outros 81 cães foram considerados negativos ( $n=81/251$ ; 32,3%), de acordo com os critérios enunciados anteriormente. Desta forma, a distribuição de animais positivos e negativos por distrito pode ser observada na Figura 12.

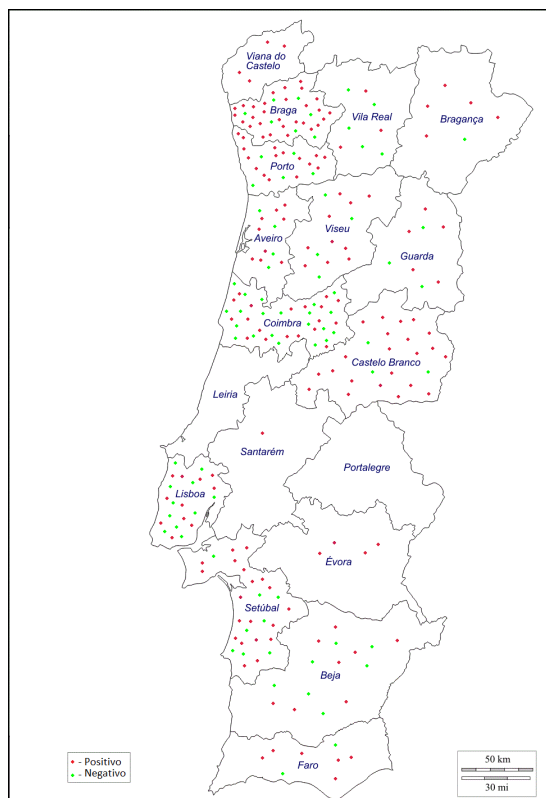


Figura 12 – Mapa de Portugal continental com a distribuição de animais positivos e negativos por distrito.

Após o cruzamento da informação do sexo do animal com o diagnóstico (Tabela 8), pareceu existir uma proporção bastante mais elevada de casos positivos de doença entre os animais do sexo masculino que foram analisados do que entre os animais do sexo feminino.

Tabela 8 – Distribuição de animais consoante o sexo e positividade/negatividade no diagnóstico de Lcan.

			Diagnóstico		Total
			Negativo	Positivo	
Sexo	Feminino	Número	44	62	106
		% do Total	17,5%	24,7%	42,2%
	Masculino	Número	37	108	145
		% do Total	14,7%	43,0%	57,8%
Total		Número	81	170	251
		% do Total	32,3%	67,7%	100,0%



De forma a tentar avaliar a significância desta relação entre sexo (masculino e feminino) e diagnóstico (animais positivos ou negativos), realizou-se um Teste de Qui-quadrado (Tabela 9). Após a visualização da nota de rodapé a., verificou-se que as condições de aplicabilidade deste teste foram respeitadas, uma vez que existem 0 células (0%) com contagem menor que 5 e que a contagem esperada é 34,21 (superior a um).

Por se tratar de uma tabela 2x2, os resultados do teste são dados na linha Correção de continuidade, onde podemos observar que o valor para a estatística de teste é 6,452 a que corresponde um valor-p assintótico de 0,011. Deste modo, rejeita-se a hipótese das duas variáveis em estudo serem independentes, donde se conclui que existe associação entre o sexo do animal e o diagnóstico de Lcan.

Tabela 9 – Teste de Qui-quadrado.

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
<b>Qui-quadrado de Pearson</b>	7,165 <sup>a</sup>	1	0,007	-	-
<b>Correção de continuidade<sup>b</sup></b>	6,452	1	0,011	-	-
<b>Razão de verossimilhança</b>	7,125	1	0,008	-	-
<b>Teste Exato de Fisher</b>	-	-	-	0,009	0,006
<b>Nº de Casos Válidos</b>	251	-	-	-	-

a. 0 células (0,0%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 34,21.

b. Calculado apenas para uma tabela 2x2

Após diferenciar os animais positivos dos negativos, elaboraram-se tabelas e representações gráficas onde a sua distribuição se cruzou com os parâmetros das análises laboratoriais (Creatinina, Alanina Aminotransferase, Proteínas Totais, Rácio Albumina/Globulinas, Proteínas Beta e Proteínas Gama).

Vários animais realizaram também análises bioquímicas e proteinogramas no momento do diagnóstico, mas por questões de simplificação e de importância clínica para o quadro de Leishmaniose, selecionaram-se apenas alguns parâmetros: Creatinina, Alanina Aminotransferase (ALT), Proteínas Totais (PT), Rácio Albumina/Globulinas (Rácio A/G), Globulinas Beta e Globulinas Gama. A sua distribuição pode ser observada na Tabela 10.

Tabela 10 – Distribuição de casos por parâmetros bioquímicos analisados e cálculo de medidas de localização e dispersão, consoante o diagnóstico.

	Diagnóstico					
	Negativo			Positivo		
	Nº	Média	Desvio padrão	Nº	Média	Desvio padrão
<b>Creatinina</b>	7	0,97	0,35	54	1,27	0,87
<b>ALT</b>	7	55,78	37,43	49	52,08	50,217
<b>Prot. Totais</b>	11	7,06	0,71	70	8,04	1,53
<b>Rácio A/G</b>	9	1,16	0,23	52	0,88	0,40
<b>Beta T0</b>	9	17,00	5,50	50	16,40	7,90
<b>Gama T0</b>	9	16,50	10,50	50	26,70	14,30

Desta forma, verifica-se uma predominância de análises ao parâmetro Proteínas Totais, com 81 casos (32,3%). Também se verificou que: 61 animais realizaram análises ao parâmetro Creatinina e Rácio Albumina/Globulina (24,3% cada); 59 animais realizaram Globulinas Beta e Gama (23,5% cada); e 56 animais realizaram ALT (22,3%).

Relativamente à Creatinina, verificou-se que 8 casos se situaram acima do valor máximo de referência (1,7 mg/dl), e que os mesmos eram todos positivos no diagnóstico de Leishmaniose, como se observa no Gráfico 4.

Nos valores dos animais considerados positivos, a média correspondeu a 1,27 com um máximo de 5,31 e um mínimo de 0,44. Também se verificou que um quarto dos valores se encontrava até ao valor 0,84 e que 25% tiveram no mínimo o valor de 1,38. No caso dos animais considerados negativos, observou-se uma média de 0,97. Nestes, também se verificou que 25% dos valores tiveram 0,67 como máximo e que um em cada quatro animais teve 3,69 como mínimo.

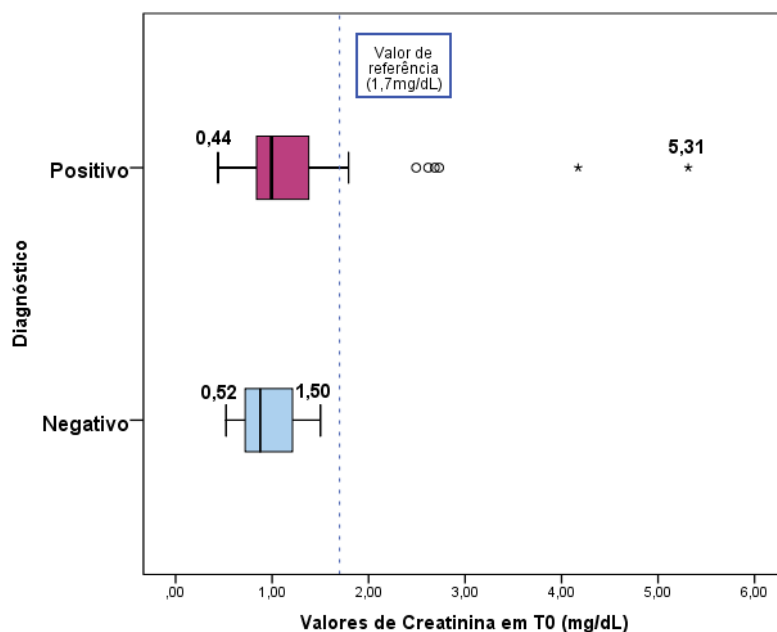


Gráfico 4 – Gráfico caixa de bigodes sobre resultados de análises ao parâmetro creatinina em T0.

Os resultados do parâmetro ALT podem-se observar no Gráfico 5. Verificaram-se seis casos em que os resultados se situaram acima do valor máximo de referência (109 U/L). Destes, apenas um caso correspondeu a um animal negativo no diagnóstico de Lcan, sendo os restantes cinco casos positivos. Nestes últimos observou-se uma média de 52,08 com um máximo de 272,09 e um mínimo de 10,67. Este valor máximo constituiu um valor atípico que se destacou do conjunto de dados e que enviesou o cálculo da média. Esse enviesamento foi confirmado através da verificação de que um quarto destes animais tiveram no máximo o valor de 24,52 e que 25% tiveram no mínimo o valor de 52,62.

No caso dos animais considerados negativos, observou-se uma média de 55,78, um máximo de 116,78 e um mínimo de 15,78. Também se verificou que um em cada quatro animais tiveram 32,66 como valor máximo e que 25% dos animais teve 98,00 como mínimo.

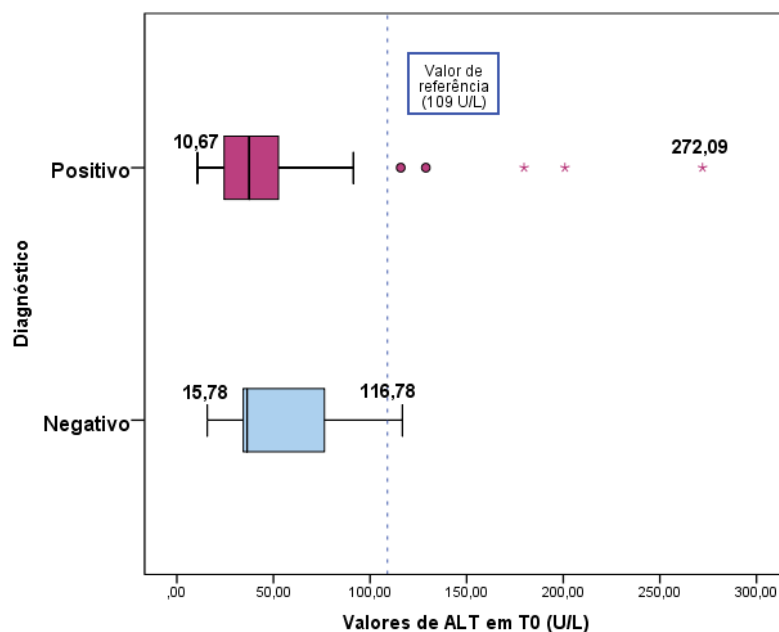


Gráfico 5 - Gráfico caixa de bigodes sobre resultados de análises ao parâmetro alanina aminotransferase em T0.

Em relação ao parâmetro Proteínas Totais, verificaram-se 44 resultados acima do valor máximo de referência (7,5 g/dl), e os mesmos podem-se observar no Gráfico 6. De entre estes, apenas se verificaram dois casos negativos ao diagnóstico de Leishmaniose.

No caso dos animais considerados positivos observou-se uma média de 8,04 com um máximo de 13,90 e um mínimo de 5,30. Tal como no parâmetro anterior (ALT), também se observou que o máximo constituiu um valor atípico, o qual enviesou o cálculo da média. Além destes, também se verificou que um quarto dos animais tiveram um valor máximo de 6,70 e que 25% dos animais teve 13,90 como mínimo.

Por sua vez, no caso dos animais considerados negativos obteve-se uma média de 7,06, um máximo de 8,70 e um mínimo de 6,50. Ainda se observou que um em cada quatro animais tiveram 6,50 como valor máximo e que 25% dos animais teve 7,40 como mínimo.

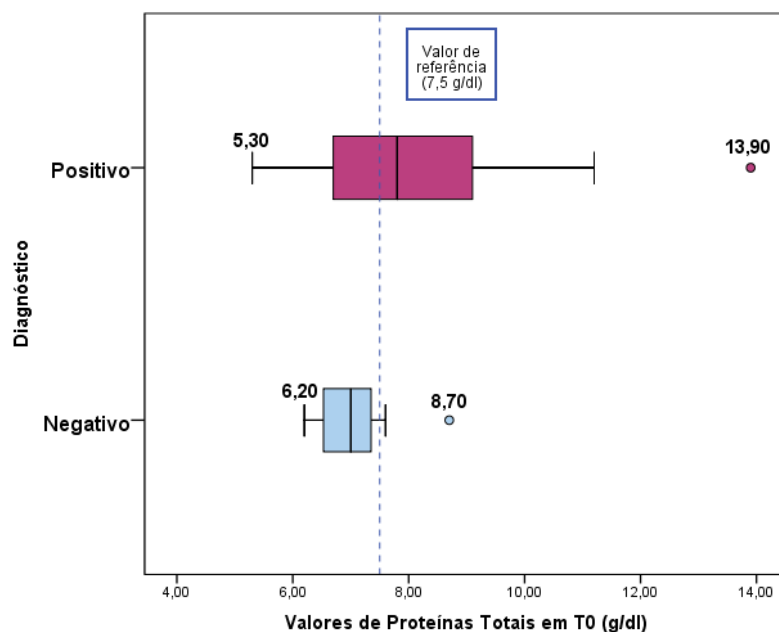


Gráfico 6- Gráfico caixa de bigodes sobre os resultados de análises ao parâmetro proteínas totais em T0.

Os valores relativos aos resultados do parâmetro Rácio Albumina/Globulina podem-se observar no Gráfico 7. Neste, verificaram-se 19 casos em que os resultados se situaram acima do valor máximo de referência (1,1). Destes, apenas cinco casos corresponderam a animais negativos ao diagnóstico de Leishmaniose, sendo os restantes positivos.

A média dos resultados positivos foi de 0,88, o mínimo foi 0,200 e o máximo foi 2,21. Ainda se verificou que um em cada quatro animais tiveram 0,54 como valor máximo e que 25% dos animais teve 1,16 como mínimo.

No caso dos animais considerados negativos obteve-se uma média de 1,16, um máximo de 1,52 e um mínimo de 0,81. Além destes, também se verificou que um quarto dos animais tiveram um valor máximo de 1,06 e que 25% dos animais teve 1,29 como mínimo.

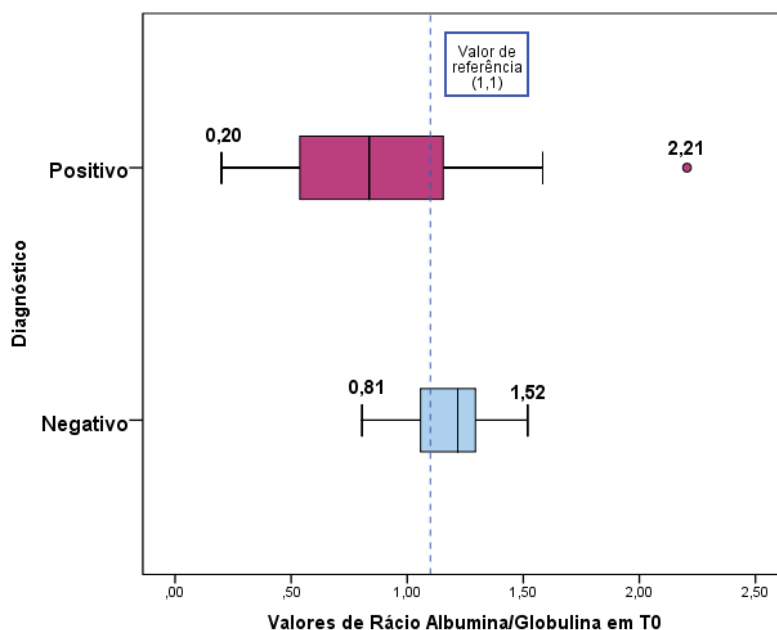


Gráfico 7- Gráfico caixa de bigodes sobre os resultados de análises ao parâmetro rácio albumina/globulina em T0.

Relativamente aos valores obtidos nas análises aos parâmetros Globulinas Beta e Globulinas Gama, verificou-se que todos os casos testados (59) se situaram acima dos valores máximos de referência (1,2 g/dl e 1,8 g/dl, respetivamente), como se pode observar nos Gráficos 8 e 9.

No caso dos resultados das análises às Globulinas Beta:

- Para os animais considerados positivos calculou-se uma média de 16,40, um máximo de 34,60 e um mínimo de 4,6. Também se verificou que um quarto dos animais tiveram um valor máximo de 10,10 e que 25% dos animais teve 34,90 como mínimo.
- Para os resultados dos animais considerados negativos obteve-se uma média de 17,00, um máximo de 24,80 e um mínimo de 10,5. Ainda se observou que um em cada quatro animais tiveram 12,70 como valor máximo e que 25% dos animais teve 21,2 como mínimo.

Por sua vez, no caso dos resultados das Globulinas Gama:

- Para os animais considerados positivos obteve-se uma média de 26,70, um máximo de 62,8 e um mínimo de 2,6. Ainda se verificou que 25% dos animais obtiveram no máximo o valor de 14,60 e que 25% dos animais teve 34,90 como mínimo.
- Para os resultados dos animais considerados negativos calculou-se uma média de 16,50, um máximo de 40,20 e um mínimo de 5,00. Também se observou que um quarto dos animais tiveram um valor máximo de 10,90 e que 25% dos animais teve um mínimo de 17,30.

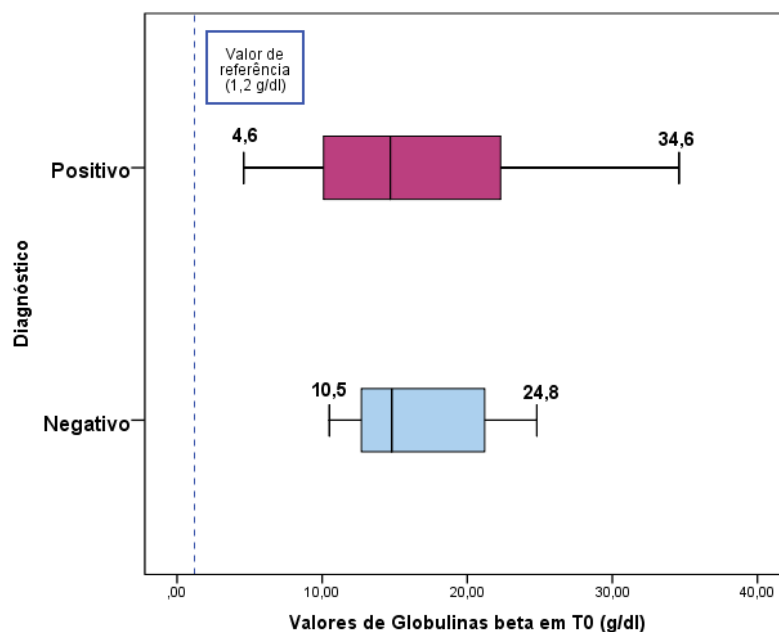


Gráfico 8- Gráfico caixa de bigodes sobre os resultados de análises ao parâmetro globulinas beta em T0.

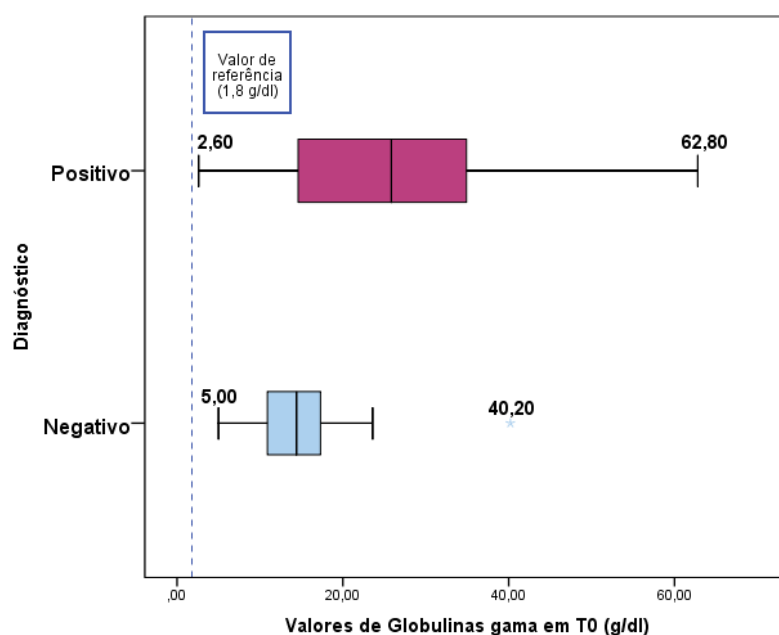


Gráfico 9- Gráfico caixa de bigodes sobre os resultados de análises ao parâmetro globulinas gama em T0.

O mês em que foram diagnosticados os casos positivos de Lcan também apresentou algumas variações, como se pode observar no Gráfico 10.

Os meses em que foram realizados mais exames diagnósticos foram: Julho (12,4%), Junho (11,8%) e Setembro (10,6%). Verificou-se desta forma uma predominância de exames

processados nos meses quentes (Verão), com exceção de Agosto onde o número diminui consideravelmente (8,8%).

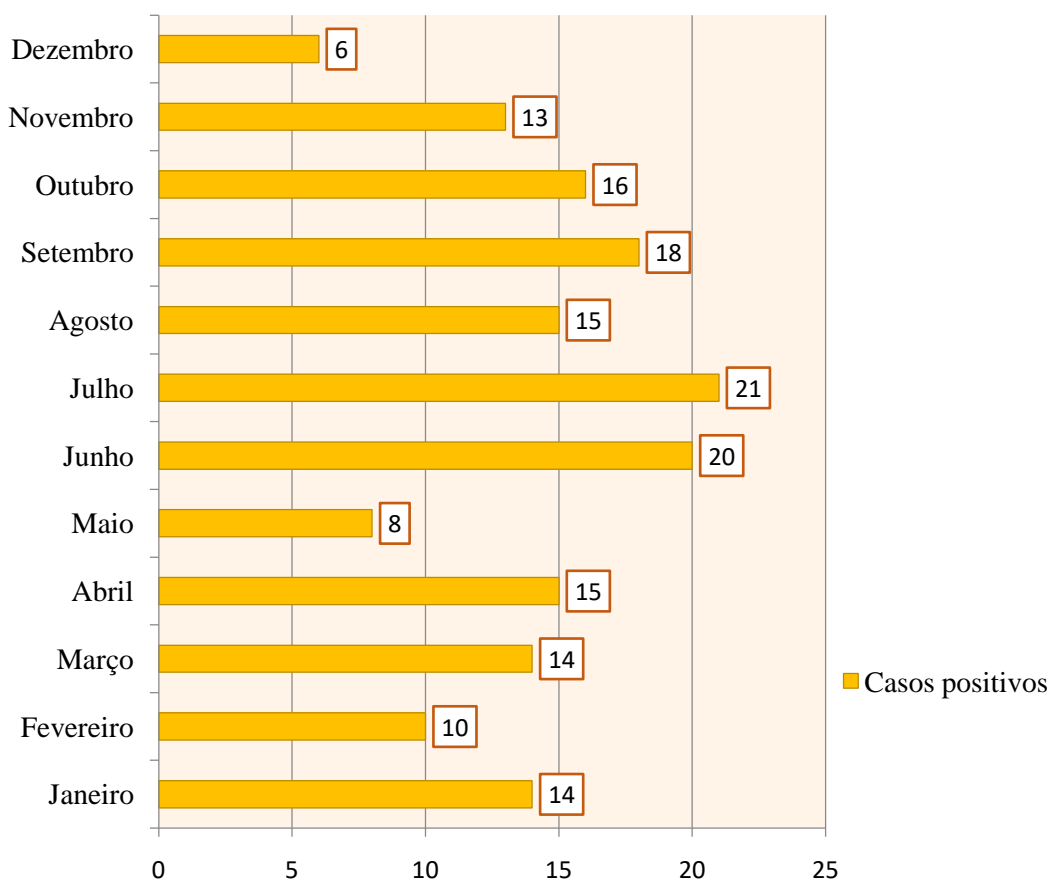


Gráfico 10 - Distribuição de cães positivos no diagnóstico de Lcan, por mês.

#### **4.2 Caracterização dos dados relativos aos inquéritos:**

Tal como referido anteriormente, foram enviados inquéritos relativos aos casos positivos no diagnóstico de Lcan (170), e desses obtiveram-se 98 respostas ( $n=98/170$ ; 57,6%).

Foram questionadas várias informações relacionadas com o historial clínico de cada caso: sinais clínicos presentes na altura do mesmo, quais os métodos de diagnóstico aplicados além da serologia *ELISA*, e quais os protocolos terapêuticos aplicados em cada caso.

Estes inquéritos foram submetidos apenas aos CAMVs que enviaram as amostras positivas, pois a questão relativa aos protocolos terapêuticos só se aplica aos animais positivos (uma vez que estes são tratados e os animais negativos não o são).

O modelo dos inquéritos pode ser visualizado no Anexo 1.

##### **4.2.1 Sinais clínicos:**

Dos sinais clínicos que podem fazer parte do quadro clínico de Lcan, questionou-se a presença de alguns (considerados mais comuns): linfadenomegália, alterações cutâneas,



perda de peso, onicogrifose, anorexia, lesões oculares, diarreia crônica, epistáxis, alterações locomotoras e alterações neurológicas. Além destes, colocou-se uma opção de resposta aberta denominada “Outros”, para que pudessem ser listados outros sinais clínicos que estivessem presentes em cada caso e não estivessem disponíveis nas opções do questionário. Os valores podem ser observados na Tabela 11.

Verificou-se que os sinais clínicos mais comuns foram: Alterações cutâneas (em 67 animais, 68,37%), Perda de peso (em 47 animais, 47,96%) e Linfadenomegália (em 33 animais, 33,67%).

Em relação à presença dos restantes sinais clínicos, observou-se a seguinte distribuição: onicogrifose em 29 animais; anorexia em 18 animais; lesões oculares (blefarite, conjuntivite, uveíte) em 17 animais; diarreia crônica em três animais; epistáxis em dez animais; alterações locomotoras (claudicação devido a poliartrite, sinovite, periostite, osteomielite) em 14 animais; alterações neurológicas (ataxia, paralisia, parésia e convulsões) em três animais.

Além destes, também se registaram quais as respostas para a questão “Outros”. Nesta, verificou-se que 20 responderam que outros sinais clínicos estavam presentes e no momento do diagnóstico além dos questionados. Nas respostas da questão “Outros”, destacaram-se: três casos em que os animais em questão não apresentavam sinais clínicos no momento do diagnóstico, dois casos em que apresentaram incontinência urinária, e outros dois em que apresentaram Lesões nos pavilhões auriculares. Os restantes sinais clínicos, bem como as suas distribuições por frequências, podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 11 – Frequência relativa (%) da resposta de cada questão, relativa aos sinais clínicos.

<b>Sinais clínicos</b>	<b>Respostas (%)</b>	
	<b>Sim</b>	<b>Não</b>
<b>Alterações cutâneas</b>	68,37 %	31,63 %
<b>Linfadenomegália</b>	33,67 %	66,33 %
<b>Perda de peso</b>	47,96 %	52,04 %
<b>Onicogrifose</b>	29,59 %	70,41 %
<b>Anorexia</b>	18,37 %	81,63 %
<b>Lesões oculares</b>	17,35 %	82,65 %
<b>Diarreia crônica</b>	3,06 %	96,94 %
<b>Epistáxis</b>	10,20 %	89,80 %
<b>Alterações locomotoras</b>	14,29 %	85,71 %
<b>Alterações neurológicas</b>	3,06 %	96,94 %
<b>Outros</b>	20,40 %	79,60 %

Tabela 12 – Distribuição de respostas da questão “Outros”, por casos.

Respostas	Frequência absoluta	Porcentagem
Dermatite escrotal	1	1,02
Febre	1	1,02
Glossite e queilite	1	1,02
Hematúria recorrente	1	1,02
Hipertermia	1	1,02
Incontinência urinária	2	2,04
Lesões nos pavilhões auriculares	2	2,04
Nódulos sublinguais	1	1,02
Poliúria e Polidipsia	1	1,02
Sem sintomatologia	3	3,06
Tumefação na glândula peniana	1	1,02
Vasculite	1	1,02
Vômitos	1	1,02
Não apresentavam outros sinais	80	78,59
Diagnosticado por outro veterinário	1	1,02
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>100,0</b>

Além de se verificar quais foram os números de casos em cada questão, também se observaram quantos animais possuíam um ou mais sinais clínicos em simultâneo no momento do diagnóstico (Gráfico 11). Observou-se que a maioria (27,55%) dos animais apresentava apenas um sinal clínico, e que nenhum animal apresentou mais do que sete sinais clínicos em simultâneo.

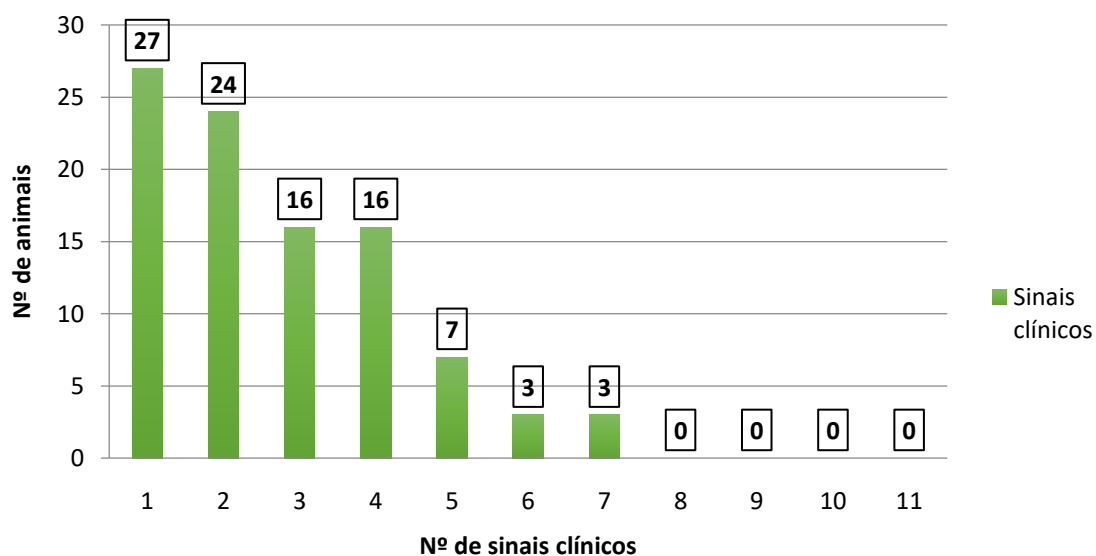


Gráfico 11 – Número de animais consoante o número de sinais clínicos apresentados em T0.

#### 4.2.2 Métodos de diagnóstico

Tal como referido na revisão bibliográfica, atualmente existem diversos métodos que fazem parte da rotina e que são utilizados para diagnóstico da Lcan. Com exceção dos métodos serológicos *ELISA*, questionou-se a realização dos seguintes: Imunofluorescência Indireta, Citologia, Histopatologia e o método molecular de PCR (*Polimerase Chain Reaction*).

Além destes, colocou-se uma opção de resposta aberta denominada “Outros”, para que fossem indicados outros métodos de diagnóstico realizados em cada caso e que não estivessem disponíveis nas opções do questionário. Os valores podem ser observados na Tabela 13.

Verificou-se que os métodos de diagnóstico mais utilizados (além da Serologia *ELISA* que se verificou em 100% dos casos), foram a imunofluorescência indireta e a citologia em 5 casos cada (5,10%).

Em relação à utilização dos restantes métodos de diagnóstico, observou-se a utilização de histopatologia em três casos (3,06%) e o PCR em dois casos (2,04%).

Por sua vez, na questão “Outros” verificou-se que em onze casos (11,23%) se utilizaram testes rápidos de imunocromatografia e que outros dois casos (2,04%) se recorreram de outras análises laboratoriais (hemograma e análises bioquímicas).

Tabela 13 – Frequência relativa (%) da resposta de cada questão, relativa aos métodos de diagnóstico.

Métodos de diagnóstico	Respostas (%)	
	Sim	Não
Imunofluorescência indireta	5,10 %	94,90 %
Citologia	5,10 %	94,90 %
Histopatologia	3,06 %	96,94 %
PCR	2,04 %	97,96 %
Outros	13,27%	86,73 %

Tal como nas questões dos sinais clínicos, após se verificarem quais foram os números de casos em cada questão, observaram-se quantos animais recorreram a um ou mais métodos de diagnóstico em simultâneo (Gráfico 12). Observou-se que a maioria (78,57%) dos casos recorreu apenas um método, e que nenhum utilizou mais do que três métodos de diagnóstico em simultâneo.

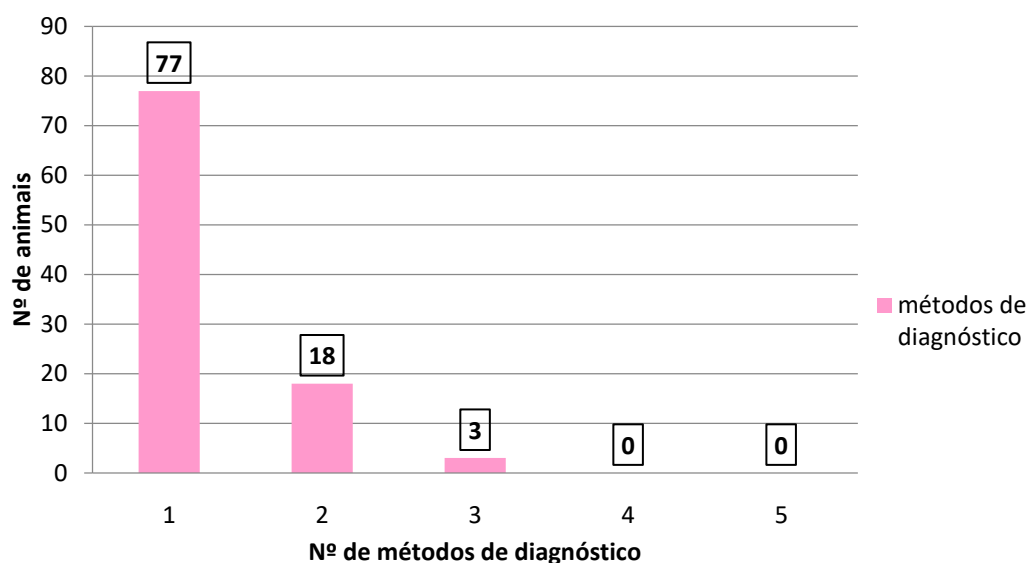


Gráfico 12 – Número de animais consoante o número de métodos de diagnóstico utilizados em T0.

#### 4.2.3 Protocolos terapêuticos aplicados

Dos fármacos que estão recomendados ou sugeridos (de forma experimental) para a terapêutica da Lcan, questionaram-se a aplicação dos seguintes: Antimoniato de meglumina, Estibogluconato de sódio, Antibióticos (tais como Pentamidina, Anfotericina B e Aminosidina), Derivados do Imidazol (tais como Metronidazol, Ketoconazol, Itraconazol e Secnidazol), Alopurinol, Herbicida Dinitroanilina (Trifluralina), Miltefosina, Imunomoduladores (tais como Prednisona, Prednisolona e Levamizol) e Interferão Gama.

Além destes, (tal como nas questões anteriores dos sinais clínicos e métodos de diagnóstico) colocou-se uma opção de resposta aberta denominada “Outros”. Esta serviu para que pudessem ser indicados outros protocolos terapêuticos que foram aplicados em cada caso e que não estavam disponíveis nas opções do questionário. Os valores podem ser observados na Tabela 14.

Verificaram-se que os fármacos mais utilizados foram o Alopurinol em 92 casos (93,88%), a Miltefosina em 42 casos (42, 86%) e o Antimoniato de meglumina em 39 casos (39,80%). Também se notou que o Estibogluconato de sódio e o herbicida Trifluralina não foram utilizados em nenhum dos casos (0%).

Tabela 14 – Frequência relativa (%) da resposta de cada questão, relativa aos fármacos utilizados.

Fármacos utilizados	Respostas (%)	
	Sim	Não
Antimoniato de meglumina	39,80 %	60,20 %
Estibogluconato de sódio	0 %	100 %
Antibióticos	2,04 %	97,96 %
Derivados do imidazol	1,02 %	98,98 %
Alopurinol	93,88 %	6,12 %
Herbicida Trifuralina	0 %	100 %
Miltefosina	42,86 %	57,14 %
Imunomoduladores	7,14 %	92,86 %
Interferão gama	1,02 %	98,98 %
Outros	34,69 %	65,31 %

Por sua vez, na questão “Outros” destacou-se a utilização de Domperidona em 25 casos (25,51%). Os restantes fármacos, bem como as suas distribuições, podem ser observados na Tabela 15.

Tabela 15 - Distribuição de respostas da questão “Outros”, por casos.

Respostas	Frequência	Percentagem (%)
Domperidona	25	25,51
Probióticos	3	3,06
Suplementos Ác. Gordos omega 3	2	2,04
Terapêutica de outras patologias	1	1,02
Terapêutica homeopática	3	3,06
Não utilizaram outros métodos	64	65,31
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>100,0</b>

#### **4.3 Associação estatística entre variáveis (dados de análises serológicas e os dados dos inquéritos)**

Após a recolha de informações relativas aos inquéritos, agruparam-se os casos por grupo de terapêutica, de forma a facilitar a terapêutica dos dados. Os grupos formados foram: Alopurinol; Alopurinol e outros; Alopurinol e Antimoniato; Alopurinol, Miltefosina e

Imunomoduladores; Alopurinol, Antimoniato e outros; Alopurinol, Antimoniato e Imunomoduladores; Alopurinol, Miltefosina e outros; Miltefosina; Outros; Alopurinol e Miltefosina; Alopurinol, Miltefosina e Antimoniato.

Posteriormente à observação dos resultados obtidos neste teste, verificou-se que todos os grupos de terapêutica exibiram um valor-p (Sig.) superior ao  $\alpha$  (0,05), como se pode observar na Tabela 16. Desta forma assumiu-se que o pressuposto de normalidade era válido.

Além de se elaborarem representações gráficas das médias dos grupos terapêuticos (com exceção dos que eram constituídos por um número reduzido de casos, como os que tinham dois ou três animais), realizaram-se testes de t-student para dados emparelhados, de modo a determinar se a diferença entre as médias de T0 e T1 foi estatisticamente significativa em cada grupo. Considerou-se um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 16 – Teste de normalidade Shapiro-Wilk para os dados serológicos dos grupos de terapêutica.

Dados serológicos por grupos de terapêutica		Shapiro-Wilk		
		Estatística	Nº casos	Sig.
T0	Alopurinol	0,961	10	0,803
	Alopurinol e outros	0,900	8	0,286
	Alopurinol e Antimoniato	0,969	22	0,694
	Alopurinol, Miltefosina e Imunomoduladores	-	-	-
	Alopurinol, Antimoniato e outros	0,880	7	0,225
	Alopurinol, Antimoniato e Imunomoduladores	0,971	5	0,880
	Alopurinol, Miltefosina e outros	0,989	10	0,995
	Miltefosina	-	-	-
	Outros	-	-	-
	Alopurinol e Miltefosina	0,982	22	0,949
	Alopurinol, Miltefosina e Antimoniato	-	-	-
T1	Alopurinol	0,990	10	0,996
	Alopurinol e outros	0,902	8	0,298
	Alopurinol e Antimoniato	0,951	22	0,337
	Alopurinol, Miltefosina e Imunomoduladores	-	-	-
	Alopurinol, Antimoniato e outros	0,812	7	0,054
	Alopurinol, Antimoniato e Imunomoduladores	0,968	5	0,864
	Alopurinol, Miltefosina e outros	0,930	10	0,448
	Miltefosina	-	-	-
	Outros	-	-	-
	Alopurinol e Miltefosina	0,964	22	0,572
	Alopurinol, Miltefosina e Antimoniato	-	-	-

### 4.3.1 Grupos de terapêutica

#### 4.3.1.1 Alopurinol:

Observaram-se dez casos que utilizaram apenas Alopurinol como terapêutica, e a sua distribuição de títulos de Ac pode ser observada no Gráfico 13.

Verificou-se que em T0, estes obtiveram valores entre 1,50 e 4,00, com uma média de 2,92. Também se verificou que um quarto dos animais tiveram no máximo um valor de 2,38 e 25% tiveram no mínimo um valor de 3,69. No caso de T1, verificou-se um máximo de 3,06 e um mínimo de 0,40, com uma média de 1,66. Também se verificou que um em cada quatro animais tiveram um valor de 1,17 como máximo e que 25% tiveram um valor de 2,10 no mínimo.

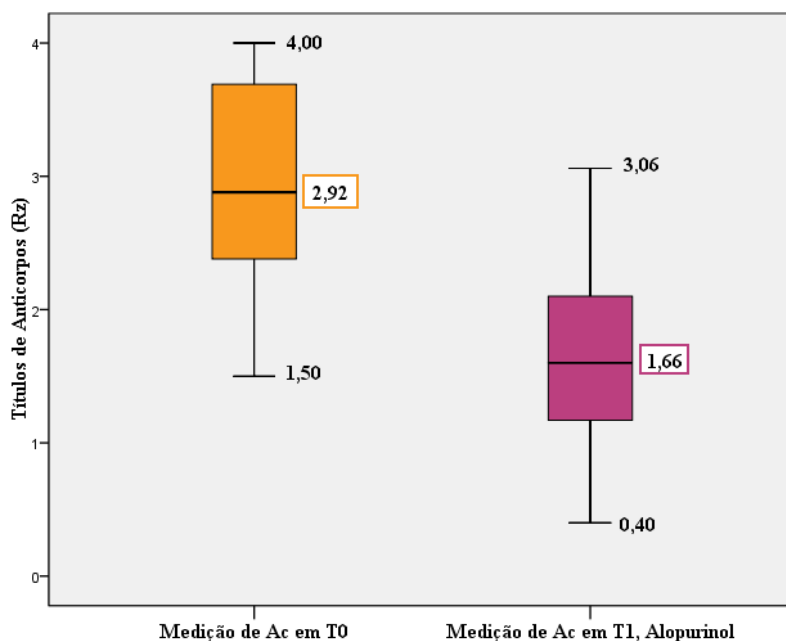


Gráfico 13– Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol.

De forma a verificar se a diferença entre médias foi estatisticamente significativa, aplicou-se um teste de t-student para dados emparelhados.

Na Tabela 17 pôde-se observar que a média dos títulos de anticorpos ao diagnóstico é superior à média dos títulos de anticorpos após a terapêutica. Esta diminuição do título de Ac pode ser indicador de que houve uma melhoria no estado geral dos pacientes, que se traduziu numa diminuição da carga parasitária, devida à aplicação do plano de terapêutica (Alopurinol) entre análises.

O desvio padrão correspondeu à diferença entre as medições de T0 e T1 correspondentes ao mesmo animal.

Tabela 17 - Análise descritiva do teste de t-Student

	Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
<b>T0</b>	2,92	10	0,83	0,26
<b>T1</b>	1,66	10	0,76	0,24

Por sua vez, na Tabela 18 pôde-se observar que a média apresentada, correspondeu à diferença entre as médias de T0 e T1 descritas na tabela acima. Nesta, também se observou-se que o valor-p foi 0,001, e como este foi inferior ao nível de significância (0,05), rejeitou-se a hipótese nula e concluiu-se que a diferença entre as médias de T0 e T1 foi estatisticamente significativa.

Relativamente ao intervalo de confiança, pode-se deduzir que existiu 95% de confiança de que a diferença entre as médias de T0 e T1 se situou entre 0,68 e 1,84. Além disso, pôde-se dizer com confiança que os títulos de Ac ao diagnóstico são maiores que os títulos de Ac após o início da terapêutica.

Tabela 18 – Resultados do teste de t-Student

	Diferenças emparelhadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
				Inferior	Superior			
T0 - T1	1,26	0,81	0,26	0,68	1,84	4,89	9	0,001

#### 4.3.1.2 Alopurinol e outros:

No grupo em que se utilizou Alopurinol e outros como terapêutica observaram-se oito casos, e a sua distribuição de títulos de Ac pode ser verificada no Gráfico 14.

Nestes, verificou-se que em T0 obtiveram valores compreendidos entre 1,20 e 3,90, com uma média de 2,23. Além disso, observou-se que 25% dos animais obtiveram um valor máximo de 1,25 e um em cada quatro tiveram 2,95 como mínimo. Por sua vez, em T1 verificou-se um máximo de 2,80 e um mínimo de 0,34, com uma média de 1,48. Também se verificou que um quarto dos animais tiveram um valor máximo de 0,65 e 25% dos animais tiveram um valor mínimo de 2,34.



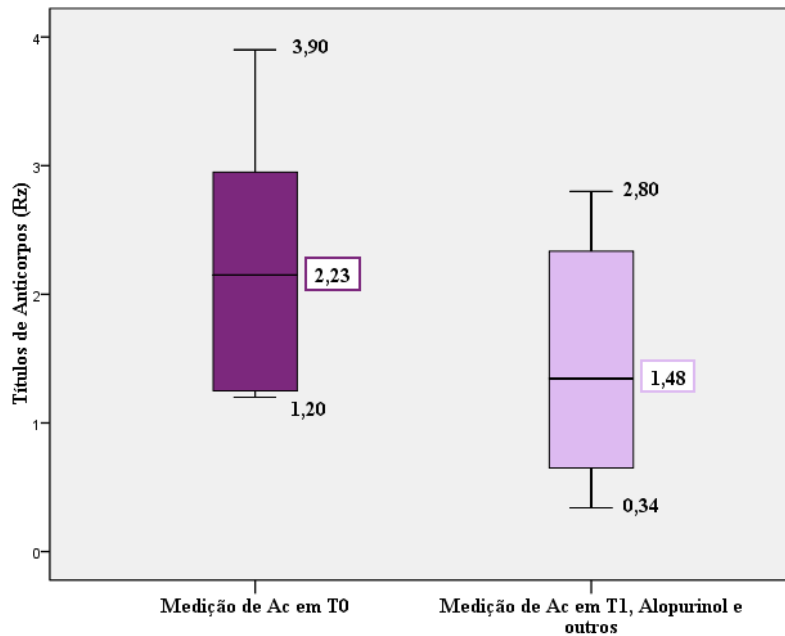


Gráfico 14 – Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol e outros.

Tal como no grupo terapêutico anterior, pôde-se observar (na Tabela 19) que a média dos títulos de Ac ao diagnóstico foi superior à média dos títulos de Ac após o início da terapêutica. Observou-se também um desvio padrão de 1,01 em T0 e de 0,95 em T1.

Tabela 19 - Análise descritiva do teste de t-Student

	Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
T0	2,23	8	1,01	0,36
T1	1,48	8	0,95	0,34

De forma semelhante ao grupo terapêutico anterior, também se observou (na Tabela 20) que o valor-p foi 0,029 ( $p < \alpha$ ), rejeitou-se a hipótese nula e concluiu-se que a diferença entre as médias de T0 e T1 foi estatisticamente significativa. Também se pôde deduzir que existiu 95% de confiança de que a diferença entre as médias de T0 e T1 se situou entre 0,10 e 1,4

Tabela 20 – Resultados do teste de t-Student

	Diferenças emparelhadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
				Inferior	Superior			
T0 - T1	0,75	0,78	0,278	0,10	1,40	2,74	7	0,029

#### 4.3.1.3 Alopurinol e Antimoniato de meglumina:

Relativamente ao grupo em que se utilizou Alopurinol e Antimoniato de N metil meglumina como terapêutica verificou-se a existência de 22 casos, e a sua distribuição de títulos de Ac pode ser observada no Gráfico 15.

Em T0, estes obtiveram valores compreendidos entre 1,20 e 4,85, com uma média de 2,93. Também se verificou que 25% dos animais tiveram um valor máximo de 2,20 e que um em cada quatro animais tiveram 3,80 como mínimo. Em T1 observou-se um máximo de 4,55 e um mínimo de 0,39, com uma média de 2,15. Nestes, também se verificou que um quarto dos animais tiveram um valor de 1,50 como máximo e que 25% dos animais tiveram 2,90 como mínimo.

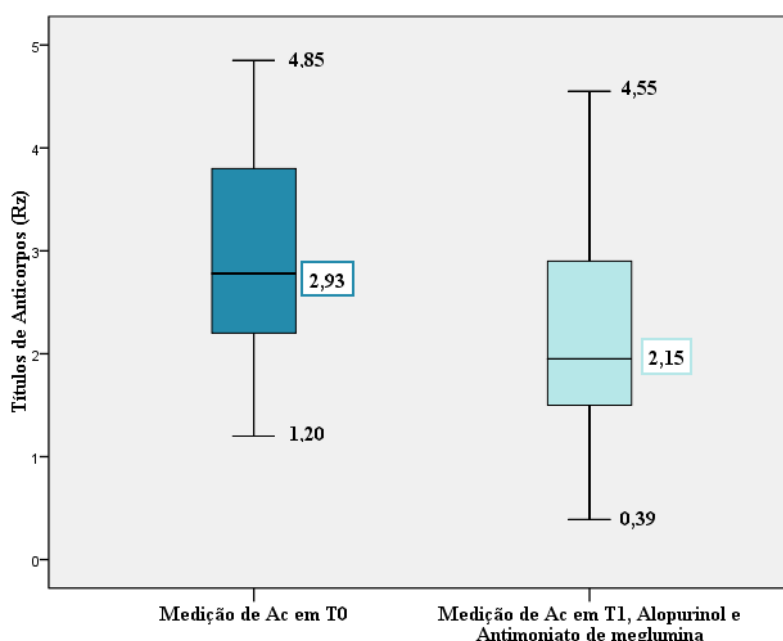


Gráfico 15 – Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol e Antimoniato de Meglumina.

Tal como nos grupos anteriores, também na Tabela 21 se pôde observar que a média dos títulos de anticorpos ao diagnóstico é superior à média dos títulos de anticorpos após o início da terapêutica. Observou-se que o desvio padrão foi de 1,03 em T0 e de 1,09 em T1.

Tabela 21 – Análise descritiva do teste de t-Student.

	Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
<b>T0</b>	2,93	22	1,03	0,22
<b>T1</b>	2,16	22	1,09	0,23

Também se pôde observar na Tabela 22 que o valor-p foi de 0,018, e como este foi inferior ao nível de significância (0,05), rejeitou-se a hipótese nula e concluiu-se que a diferença entre as médias de T0 e T1 foi estatisticamente significativa.

Relativamente ao intervalo de confiança, pôde-se deduzir que existiu 95% de confiança de que a diferença entre as médias de T0 e T1 se situou entre 0,15 e 1,40.

Tabela 22 – Resultados do teste de t-Student

	Diferenças emparelhadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
				Inferior	Superior			
T0 - T1	0,78	1,42	0,30	0,15	1,40	2,57	21	0,018

#### **4.3.1.4 Alopurinol, Miltefosina e Imunomoduladores:**

Assinalaram-se apenas três casos em que foi usada a terapêutica de Alopurinol, Miltefosina e Imunomoduladores, e por isso não se elaborou um gráfico representativo dos seus títulos de Ac em T0 e T1.

Neste grupo verificou-se que em T0 se obteve um máximo de 2,70 e um mínimo de 2,20, com uma média de 2,44. Também se observou que 25% dos animais obtiveram um valor de 2,20 como máximo e um em cada quatro animais obteve um valor de 2,70 como mínimo. Por sua vez, em T1 verificou-se que os valores variaram entre 1,80 e 4,33, com uma média de

3,37. Também se observou que um quarto dos animais teve como máximo um valor de 1,80 e 25% dos animais teve 4,33 como valor mínimo.

#### 4.3.1.5 Alopurinol, Antimoniato de meglumina e outros:

Neste grupo terapêutico registaram-se sete casos que utilizaram Alopurinol, Antimoniato de meglumina e outros, e a sua distribuição de títulos de Ac pode ser observada no Gráfico 16.

Em T0 verificou-se se obteve um máximo de 4,44 e um mínimo de 1,50, com uma média de 2,56. Além disso, verificou-se que 25% dos animais obtiveram um valor de 1,90 como máximo e um quarto dos animais tiveram 2,80 como valor mínimo. No caso de T1, verificou-se que os valores variaram entre 0,80 e 4,50, com uma média de 2,04. Também se verificou que um em cada quatro animais obtiveram um valor de 1,45 como máximo e 25% dos animais tiveram 2,20 como valor mínimo.

Neste gráfico pode-se observar que os valores máximos de T0 e T1 correspondem a *outliers* (valores atípicos representados no gráfico por pontos), o que leva a um aumento do valor da média.

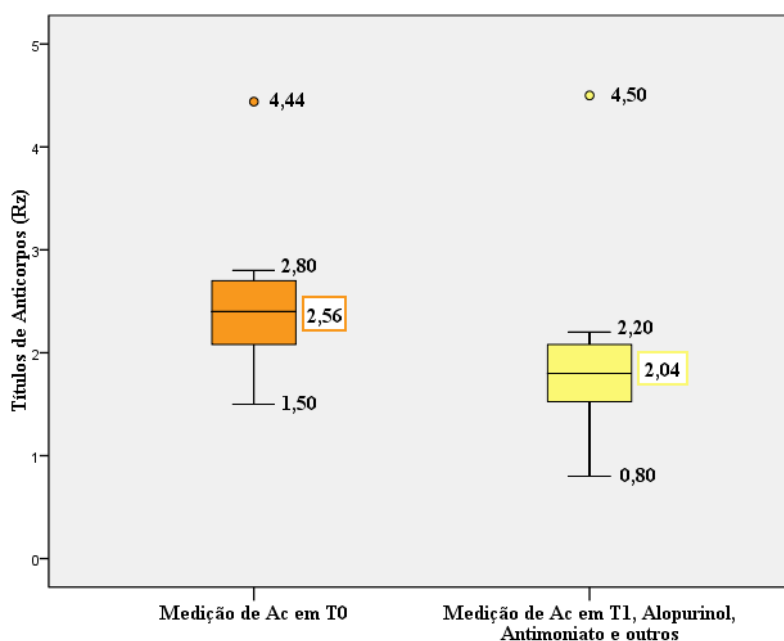


Gráfico 16 – Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol, Antimoniato de meglumina e outros.

Tal como nos grupos anteriores, também na Tabela 23 se observou que a média dos títulos de Ac ao diagnóstico foi superior à média dos títulos de Ac após o início da terapêutica,

com exceção dos valores atípicos que corresponderam ao mesmo animal. Observou-se que o desvio padrão foi de 0,94 em T0 e de 1,17 em T1.

Tabela 23 – Análise descritiva do teste de t-Student

	Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
<b>T0</b>	2,56	7	0,94	0,35
<b>T1</b>	2,04	7	1,17	0,44

Ainda se observou na Tabela 24 que o valor-p foi de 0,050 (o qual foi inferior ao nível de significância  $\alpha$ ), e por isso rejeitou-se a hipótese nula e concluiu-se que a diferença entre as médias de T0 e T1 foi estatisticamente significativa.

Em relação ao intervalo de confiança, deduziu-se que existiu 95% de confiança de que a diferença entre as médias de T0 e T1 se situou entre 0,00 e 1,04.

Tabela 24 – Resultados do teste de t-Student

	Diferenças emparelhadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
				Inferior	Superior			
T0 - T1	0,51	0,55	0,21	0,00	1,04	2,45	6	0,050

#### **4.3.1.6 Alopurinol, Antimoniato de meglumina e Imunomoduladores:**

No grupo em que se utilizou Alopurinol, Antimoniato de meglumina e Imunomoduladores como terapêutica observou-se a existência de cinco casos, e a sua distribuição de títulos de Ac pode ser verificada no Gráfico 17.

Verificou-se que em T0, se obteve um máximo de 5,42 e um mínimo de 1,10, com uma média de 3,00. Além disso, observou-se que um quarto dos animais apresentou o valor de 2,01 como máximo e que 25% dos animais tivera 3,40 como valor mínimo. No caso de T1, verificou-se um máximo de 3,75 e um mínimo de 1,10, com uma média de 2,32. Também se verificou um valor de 1,90 como máximo em 25% dos animais e que um quarto dos animais obteve 2,84 como valor mínimo.

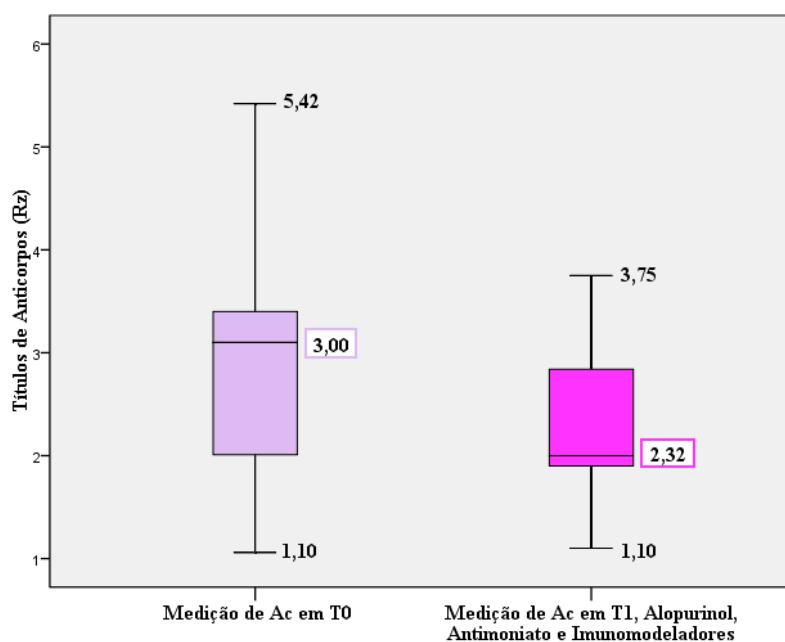


Gráfico 17 – Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol, Antimoniato de meglumina e Imunomodeladores.

De forma semelhante aos grupos anteriores, também se observou (na Tabela 25) que a média dos títulos de Ac ao diagnóstico foi superior à média dos títulos de Ac após o início da terapêutica. Deste modo, observou-se que o desvio padrão foi de 0,94 em T0 e de 1,17 em T1.

Tabela 25 – Análise descritiva do teste de t-Student

	Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
T0	2,56	7	0,94	0,35
T1	2,04	7	1,17	0,44

Também se verificou na Tabela 28 que o valor-p foi de 0,050, e por ser inferior a  $\alpha$ , rejeitou-se a hipótese nula e concluiu-se que a diferença entre as médias de T0 e T1 foi estatisticamente significativa.

O intervalo de confiança permitiu deduzir que a diferença entre as médias de T0 e T1 se situou entre 0,00 e 1,04, com 95% de confiança.

Tabela 26 – Resultados do teste de t-Student

	Diferenças emparelhadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
				Inferior	Superior			
T0 - T1	0,51	0,55	0,21	0,00	1,03	2,45	6	0,050

#### 4.3.1.7 Alopurinol, Miltefosina e outros:

Assinalaram-se dez casos em que se recorreu a Miltefosina e outros como terapêutica, e a sua distribuição de títulos de Ac pode ser observada no Gráfico 18.

Em T0 observou-se um máximo de 5,45 e um mínimo de 1,10, com uma média de 3,18. Também se verificou que 25% dos animais tiveram um valor de 2,60 como máximo e que um quarto dos animais obteve um valor de 3,80 como mínimo. Por sua vez, em T1 verificou-se que os valores variaram entre 0,70 e 4,20, com uma média de 2,88. Neste, também se verificou que um em cada quatro animais teve um valor de 2,60 como máximo e 25% dos animais tiveram 3,70 como valor mínimo.

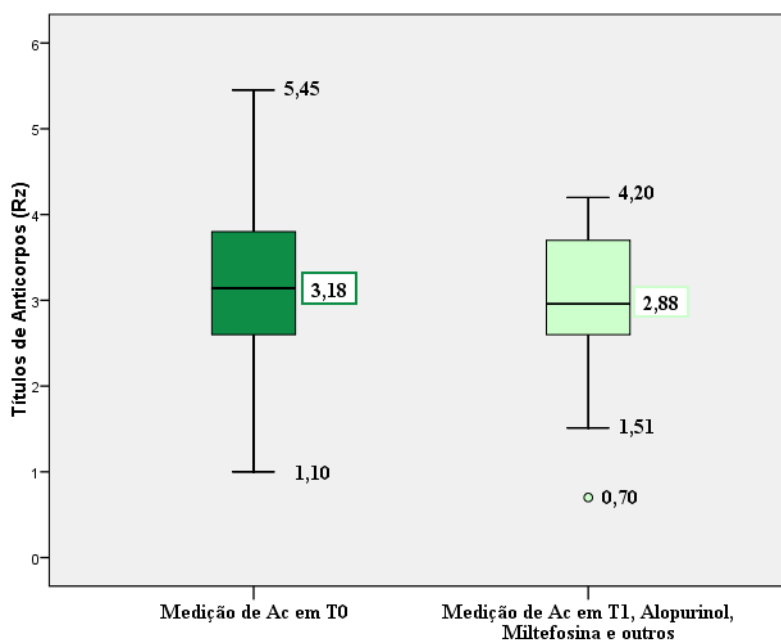


Gráfico 18 – Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol, Miltefosina e outros.

Tal como nos grupos anteriores, também se observou na Tabela 29 que a média dos títulos de Ac ao diagnóstico foi superior à média dos títulos de Ac após o início da terapêutica. Deste modo, observou-se que o desvio padrão foi de 1,28 em T0 e de 1,11 em T1.

Tabela 27 – Análise descritiva do teste de t-Student

	Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
<b>T0</b>	3,18	10	1,28	0,41
<b>T1</b>	2,88	10	1,11	0,35

Ainda se observou (na Tabela 30) que o valor-p foi de 0,44, e por ser superior ao valor  $\alpha$ , aceitou-se a hipótese nula e assumiu-se que a diferença entre as médias de T0 e T1 não foi estatisticamente significativa.

Tabela 28 – Resultados do teste de t-Student

	Diferenças emparelhadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
				Inferior	Superior			
T0 - T1	0,31	1,20	0,38	-0,56	1,17	0,80	9	0,443

#### 4.3.1.8 Miltefosina:

Observaram-se que apenas dois casos utilizaram Miltefosina como terapêutica, e por isso não se elaborou um gráfico representativo dos seus títulos de Ac em T0 e T1.

Verificou-se no entanto que em T0, estes obtiveram um máximo de 3,10 e um mínimo de 2,14, com uma média de 2,62. No caso de T1, verificou-se um máximo de 3,00 e um mínimo de 2,47, com uma média de 2,74.

Por serem apenas dois casos, verificou-se que em cada, o valor do mínimo corresponde ao valor do Percentil 25 e o valor do máximo corresponde ao valor do Percentil 75.



#### **4.3.1.9 Alopurinol, Antimoniato de meglumina e Derivados do Imidazol:**

Neste grupo, no qual foi utilizado Alopurinol, Antimoniato de meglumina e Derivados do Imidazol como terapêutica registou-se apenas um caso. Tal como no anterior, não se elaborou um gráfico representativo. Verificou-se que em T0, este obteve um valor de 1,60 e em T1 obteve um valor de 1,40. Uma vez que existe apenas um valor em T0 e T1, estes são considerados os mínimos, máximos, médias e percentis.

#### **4.3.1.10 Alopurinol, Miltefosina, Antimoniato de meglumina e outros:**

Neste grupo terapêutico de Alopurinol, Miltefosina, Antimoniato de meglumina e outros (tal como no grupo anterior) registou-se também apenas um caso. Neste caso, em T0 obteve-se um valor de 2,90 e em T1 obteve-se um valor de 2,41. Tal como no grupo terapêutico anterior, como só existe apenas um valor em T0 e T1, estes são considerados os mínimos, máximos, médias e percentis.

#### **4.3.1.11 Alopurinol, Miltefosina, Antibióticos e outros:**

Tal como nos dois grupos terapêuticos anteriores, apenas se registou um caso que utilizou Alopurinol, Miltefosina, Antibióticos e outros como terapêutica. Obteve-se um valor de 5,10 em T0 e um valor de 2,80 em T1, e da mesma forma que ocorreu nos grupos terapêuticos anteriores, como só existe apenas um valor em T0 e T1, estes são considerados os mínimos, máximos, médias e percentis.

#### **4.3.1.12 Antimoniato de meglumina:**

Novamente, tal como nos três grupos terapêuticos anteriores, registou-se um caso em que se utilizou apenas Antimoniato de meglumina como terapêutica. Neste caso, obteve-se um valor de 4,30 em T0 e um valor de 4,60 em T1. À semelhança dos anteriores grupos de terapêutica, como só existe apenas um valor em T0 e T1, estes são considerados os mínimos, máximos, médias e percentis.

#### **4.3.1.13 Alopurinol e Miltefosina:**

No grupo terapêutico em que se utilizaram Alopurinol e Miltefosina registaram-se 22 casos e a sua distribuição de títulos de Ac pode ser observada no Gráfico 19.

Verificou-se que em T0, estes obtiveram um máximo de 5,35 e um mínimo de 1,10, com uma média de 3,08. Também se verificou que 25% dos animais obtiveram um valor de 2,40 como máximo e que um quarto dos animais tiveram 3,70 como valor mínimo. No caso de T1, verificou-se uma variação de valores entre 0,60 e 4, , com uma média de 2,36. Também se verificou que um em cada quatro animais obteve um valor de 1,70 como máximo e que 25% dos animais tiveram 3,00 como valor mínimo.

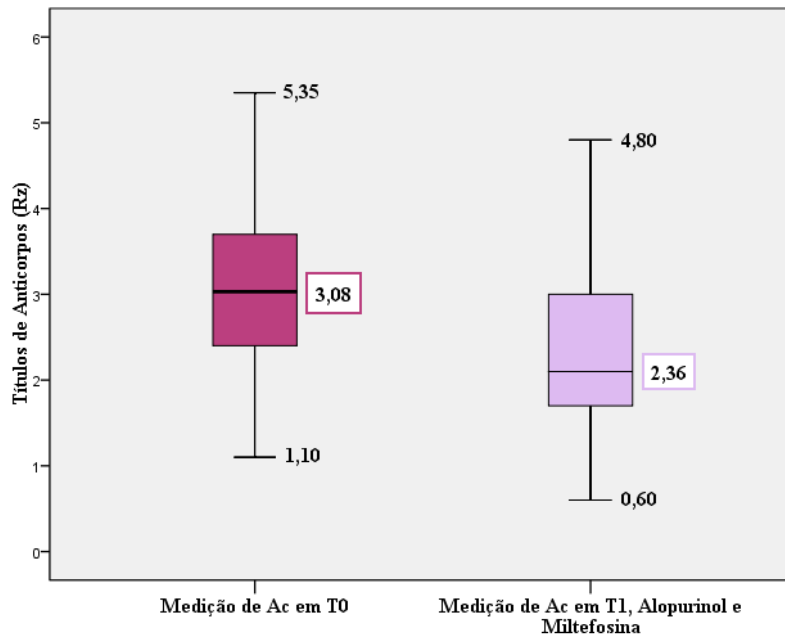


Gráfico 19 – Distribuição de títulos de Ac, no grupo de animais tratados com Alopurinol e Miltefosina.

Na Tabela 31 pode-se observar que a média dos títulos de anticorpos ao diagnóstico é maior do que a média dos títulos de anticorpos após o início da terapêutica. O desvio padrão foi de 1,18 em T0 e de 1,10 em T1.

Tabela 29 – Análise descritiva do teste de t-Student

	Média	N	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
<b>T0</b>	3,07	22	1,18	0,25
<b>T1</b>	2,36	22	1,10	0,23

Por sua vez, na Tabela 32 observou-se que o valor-p é 0,020, e como este é inferior ao nível de significância (0,05), rejeita-se a hipótese nula e conclui-se que a diferença entre as médias de T0 e T1 é estatisticamente significativa.

Em relação ao intervalo de confiança, pode-se inferir que existe 95% de confiança de que a diferença entre as médias de T0 e T1 se situa entre 0,12 e 1,31. Além disso, pode-se dizer com confiança que os títulos de Ac ao diagnóstico são maiores que os títulos de Ac após a terapêutica especificado.

Tabela 30 – Resultados do teste de t-Student

	Diferenças emparelhadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média	95% Intervalo de Confiança da Diferença				
				Inferior	Superior			
T0 - T1	0,72	1,34	0,29	0,12	1,31	2,51	21	0,020

#### **4.3.1.14 Alopurinol, Miltefosina e Antimoniato de meglumina:**

Por sua vez, no grupo terapêutico em que se utilizaram Alopurinol, Miltefosina e Antimoniato de meglumina registaram-se apenas dois casos, e por isso não se elaborou um gráfico representativo dos seus valores.

Neste grupo verificou-se que em T0, obteve-se um máximo de 2,24 e um mínimo de 1,60, com uma média de 1,92. No caso de T1, verificou-se um máximo de 2,70 e um mínimo de 1,38, com uma média de 2,04.

Por serem apenas dois casos, verificou-se que em cada, o valor do mínimo corresponde ao valor do Percentil 25 o valor do máximo corresponde ao valor do Percentil 75.

#### **4.3.1.15 Outros:**

Por fim, no último grupo de terapêutica que inclui Outros, registaram-se apenas dois casos, e à semelhança com outros grupos não se elaborou um gráfico representativo dos seus valores.

Neste grupo verificou-se que em T0, obteve-se um máximo de 4,60 e um mínimo de 1,10, com uma média de 2,85. No caso de T1, verificou-se um máximo de 1,37 e um mínimo de 1,20, com uma média de 1,29.

Tal como em outros grupos com dois casos, verificou-se que em cada, o valor do mínimo corresponde ao valor do Percentil 25 o valor do máximo corresponde ao valor do Percentil 75.

#### **4.3.2 Comparação de médias entre T0 e T1 em diferentes grupos de terapêutica**

Após observação e comparação das médias de T0 e T1 nos diferentes grupos, constatou-se que:

- O grupo que apresentou uma melhoria (diminuição da média dos títulos de Ac) mais acentuada (54,74%) foi o que utilizou “Outros” como plano terapêutico.
- Verificou-se também uma melhoria significativa (43,15%) no grupo que utilizou coma terapêutica “Alopurinol”.
- Relativamente aos planos terapêuticos recomendados para a Lcan (“Alopurinol e Antimoniato de meglumina” e “Alopurinol e Miltefosina”) também se verificou uma melhoria ligeiramente significativa (26,71% e 23,38%, respetivamente).
- Apesar de utilizarem fármacos recomendados para a terapêutica de Lcan, alguns grupos apresentaram um agravamento (aumento da média dos títulos de Ac) dos seus resultados: “Alopurinol, Miltefosina e Imunomoduladores”, “Miltefosina”, “Antimoniato de meglumina” e “Alopurinol, Miltefosina e Antimoniato de meglumina”.

## 5. Discussão:

Este estudo foi realizado com um conjunto de 251 animais (170 dos quais foram considerados positivos no diagnóstico de Lcan). Devido à reduzida dimensão da amostra em relação à população de cães existente em Portugal continental, não se podem retirar conclusões absolutas em relação à prevalência real da doença. No entanto podem-se fazer deduções válidas sobre esta amostra estudada, tendo em conta que as informações recolhidas são baseadas em resultados laboratoriais e dados fornecidos por inquéritos. Por estas razões, é de notar que alguns resultados podem não estar de acordo com as informações da revisão bibliográfica.

Verificou-se neste estudo uma prevalência maior de Lcan em animais do sexo masculino (145 animais, 57,8%) em relação ao sexo feminino (106, 42,2%).

A idade foi outro fator estudado, no qual se verificou-se que as faixas etárias com maior número de animais foram a faixa de um a três anos (66 animais, 26,3%) e a faixa de sete a nove anos (62 animais, 24,7%). Estas encontram-se de acordo com a distribuição bimodal que é mencionada em vários estudos, e nos quais se refere uma predominância de casos dos dois aos quatro anos e depois a partir dos sete anos [10].

Relativamente à distribuição pela raça na nossa população, verificou-se uma predominância de animais sem raça definida (86 animais, cerca de 34,3%). Por sua vez, as raças nas quais se verificaram maior número de casos foram Labrador (46 animais, 18,3%), Pastor Alemão (15 animais, 6%) e *Boxer* (11 animais, 4,4%). Estas últimas encontram-se de acordo com estudos anteriores em que referem que a Lcan se manifesta maioritariamente nestas raças, seja por serem de pêlo curto ou por questões genéticas (*Boxers*). Também se verificou que as raças de porte pequeno foram as que tiveram menos casos, possivelmente por estas serem consideradas maioritariamente raças que são mantidas dentro de casa (menos expostas aos vetores e a uma possível infeção) [10, 11, 112].

A distribuição de casos por cada distrito não está de acordo com o verificado em estudos relativos às zonas endémicas de Lcan em Portugal, nos quais se destacam a Região de Lisboa, a de Trás-os-Montes e Alto Douro e a Região do Algarve. [8] Na nossa amostra verificou-se que os distritos que tiveram maior número de casos foram Coimbra (40 animais, 15,9%) e Braga (35 animais, 13,9%). Os resultados diferem da bibliografia porque no nosso estudo estão presentes as amostras recebidas (cujos estabelecimentos mais perto enviam mais amostras) e não o número real de animais infetados de cada região.

O número de serologias realizadas em cada caso depende principalmente de fatores inerentes aos tutores dos animais (informação sobre o carácter crónico da Lcan e condição financeira). Por isso, observou-se que a maioria dos animais realizou apenas duas serologias (169 casos, 67,3%).

Após a seleção dos animais positivos no diagnóstico de Lcan (170 animais, 67,7%) verificou-se que a maioria eram do sexo masculino (108 animais, 43,0%). Uma vez que estudos anteriores referiram uma possível correlação entre o sexo masculino e o facto serem

positivos, realizou-se o teste do Qui-quadrado para testar essa correlação na nossa amostra [10, 112]. Desta forma, verificámos que  $p < \alpha$  (0,05), rejeitámos a hipótese nula deste teste e confirmámos que a associação entre sexo (masculino/feminino) e diagnóstico (positivos/negativos) foi significativa. Por sua vez, esta associação comprovou-nos a existência de uma correlação entre o sexo masculino e o facto de serem positivos ao diagnóstico.

Tendo em conta que a Lcan provoca lesões renais, e que estas são consideradas as principais responsáveis pelo curso fatal da doença (principalmente pela deposição de complexos imunes e destruição do parênquima renal), é aconselhada a monitorização de parâmetros de função renal que possam indicar a possibilidade de doença renal. [43, 54, 61] Desta forma, verificou-se que os oito casos (13,11%) que realizaram a medição da creatinina e que se encontraram acima dos valores máximos de referência, todos foram considerados positivos no diagnóstico de Lcan.

Tal como as lesões renais são importantes, também as lesões hepáticas surgem comumente na Lcan e podem condicionar a qualidade de vida do animal infetado. Por isso, é necessária a monitorização de algumas enzimas hepáticas, tais como a alanina aminotransferase. [43, 49, 61] Os resultados deste parâmetro demonstraram que seis casos (10,71%) se situaram acima do valor máximo de referência, e apenas um desses correspondia a um animal negativo ao diagnóstico de Lcan. Sabe-se que os aumentos de ALT estão associados a alterações específicas do fígado e a algumas alterações musculares, o que significa que o aumento deste parâmetro no caso do animal negativo pode ser devido a outra patologia que não é a Lcan. [113]

Relativamente aos proteinogramas, sabe-se que cães com Lcan que exibam sinais clínicos evidentes apresentam uma resposta inflamatória muito acentuada, na qual ocorre a produção de várias moléculas que estão envolvidas na resposta imunitária. A análise de proteínas séricas (eletroforese ou proteinograma) permite identificar anomalias no estágio inicial da Lcan, e dos seus parâmetros avaliados destacam-se as proteínas totais, rácio A/G e globulinas gama e beta [58].

Neste estudo observou-se que 44 animais (54,32%) apresentaram valores de proteínas totais superiores ao valor máximo de referência e que apenas dois desses animais foram considerados negativos no diagnóstico de Lcan. Sabe-se que os aumentos de proteínas totais estão associados com a severidade da doença no caso dos animais positivos, mas nos negativos pode estar associada a várias patologias (desidratação, processos inflamatórios, doenças auto-imunes, doenças infecciosas ou neoplasias) [114].

No parâmetro rácio albumina/globulina verificou-se que 19 animais (31,15%) tiveram resultados acima do valor máximo de referência. Destes, apenas cinco casos corresponderam a casos negativos. Alguns autores consideram que a diminuição deste parâmetro é um teste sensível para a Lcan, e que a hipoalbuminémia é considerada um fator de prognóstico negativo [58].

No que diz respeito às globulinas gama e beta, verificou-se que dos 59 animais (23,5%) que realizaram estes parâmetros, todos se situaram acima do valor máximo de referência. Destes, 9 animais (15,25%) foram considerados negativos no diagnóstico de Lcan. Estes achados são compatíveis com resultados em estudos anteriores, onde se verificou que um proteinograma típico de um animal com sinais clínicos de Lcan apresenta um aumento marcado de  $\gamma$ -globulinas (altos títulos de Ac circulantes, complexos imunes e outras moléculas) e ocasionais picos na região  $\beta$  (IgM e proteínas de fase aguda). Além de ser típico de Lcan, também se verificam estes aumentos quando existe estimulação persistente de antígenos e inflamação (no caso de desordens bacterianas crônicas, fúngicas, virais, protozoárias), neoplasia ou doenças imuno-mediadas [58, 115].

Em relação ao mês de diagnóstico, verificou-se que o mês em que foram realizados mais diagnósticos positivos de Lcan foi Julho com 21 casos (12,4%), seguido de Junho com 20 casos (11,8%) e Setembro com 18 casos (10,6%). Apesar de se verificar uma quebra no mês de Agosto (onde se verificaram 15 casos, 8,82%), tal pode ser explicado pelo fato de ser um mês em que muitos tutores vão de férias e por isso as idas ao médico veterinário são menos frequentes. Estes achados estão de acordo com a revisão bibliográfica, na qual se verificou que a altura mais favorável para a infecção é na época propícia para a proliferação dos flebótomos (desde a Primavera até ao Outono) [3, 8, 13].

Tal como referido anteriormente, a Lcan provoca um quadro variado de sinais clínicos não específicos. Neste estudo, das 98 respostas que se obtiveram com os inquéritos, os sinais clínicos mais frequentes ao diagnóstico foram as alterações cutâneas, a perda de peso e a linfadenomegália.

As alterações cutâneas estiveram presentes em 67 casos (68,4%). Estas lesões cutâneas são uns dos sinais clínicos mais comuns e por sua vez podem ser muito variadas (alopécia difusa particularmente em redor dos olhos, hiperqueratose, despigmentação, dermatite esfoliativa, lesões nodulares, ulcerações focais em vários locais, entre outras) [54].

A perda de peso também é considerada um achado clínico comum, sendo verificada em 47 casos (48%). Esta se não tratada pode-se tornar progressiva até se desenvolver caquexia acompanhada de atrofia muscular e depressão nos últimos estádios da doença. Apesar de ser um sinal clínico considerado vago, verifica-se em 25,3 a 32% dos casos em estudos anteriores. [54, 60]

Por sua vez, a linfadenomegália constituiu o terceiro sinal clínico mais comum neste estudo, verificando-se em 33 casos (33,7%). Esta está por vezes associada à perda de peso e verificou-se em 65,2 a 88,7% dos casos em estudos anteriores. [60]

A presença de onicogrifose observou-se em 29 casos (29,6%), a anorexia em 18 casos (18,3%) e as lesões oculares em 17 casos (17,3%). Estes constituem sinais clínicos observáveis, mas menos comuns que os mencionados anteriormente.

Por último, observaram-se: diarreia crónica em três casos (3%), epistaxis em dez casos (5,9%) e alterações locomotoras (14 casos, 14,3%) e neurológicas (três casos, 3%). Estes são

considerados sinais clínicos menos comuns, embora possam ser observados em alguns estudos anteriores e associados a outras patologias como a doença renal. [116] Além dos sinais clínicos mencionados anteriormente, também se verificou a presença de outros neste estudo: incontinência urinária em dois casos (2%), lesões nos pavilhões auriculares em dois casos (2%), dermatite escrotal em um caso (1%), febre num caso (1%), glossite e queilite num caso (1%), hematúria recorrente num caso (1%), hipertermia num caso (1%), nódulos sublinguais num caso (1%), poliúria e polidipsia num caso (1%), tumefação da glândula peniana num caso (1%), vasculite num caso (1%) e vômitos noutro caso (1%). Também se verificou que três casos (3%) não apresentavam qualquer tipo de sinais clínicos e que um caso (1%) foi diagnosticado por outro médico veterinário e por isso não existia informação sobre os sinais clínicos do mesmo no momento do diagnóstico.

Por último, observaram-se quantos animais apresentavam um ou mais sinais clínicos em simultâneo, sendo que a maioria (27 animais, 27,55%) apresentava apenas um sinal clínico e que nenhum animal apresentou mais do que sete sinais clínicos em simultâneo, no momento do diagnóstico.

Os métodos questionados fazem parte da rotina do diagnóstico da Lcan. Apesar de alguns serem quantitativos e outros qualitativos, estes podem ser empregues isoladamente ou em associação. A grande dificuldade que se impõe no diagnóstico da Lcan é que nenhum método é 100% sensível e 100% específico. [68]

Observou-se que o método mais utilizado (a seguir à serologia *ELISA* que se verificou em 100% dos casos, e que foi um dos critérios de seleção da população do estudo) foi o teste rápido de imunocromatografia em 11 casos (11,2%), seguido de imunofluorescência indireta (IFI) e citologia, com cinco casos cada (5,1%). Apesar do teste rápido de imunocromatografia possuir uma eficácia inferior à IFI e citologia, este encontra-se mais acessível e constitui um dos métodos mais rápidos e baratos ao alcance dos CAMV's, sendo por isso utilizado com mais frequência. A citologia e a histopatologia são os métodos qualitativos utilizados para o diagnóstico de cães com suspeita de Lcan que exibam sinais clínicos, pois estes demonstram a presença do parasita. Por sua vez, a IFI tem sido considerada como *gold standard* por alguns autores pois é um método quantitativo, mas esta depende da execução da técnica, da capacidade do operador e da interpretação dos resultados, os quais são muito subjetivos. Além disso podem ocorrer reações cruzadas com outros patógenos. [63, 68]

Os métodos de diagnóstico menos utilizados foram o PCR e a histopatologia, com dois e três casos respetivamente (2% e 3%). Apesar de estes terem sido pouco utilizados, constituem métodos diretos que possuem características muito interessantes para o diagnóstico. O PCR é considerado muito sensível e menos específico que a serologia, mas pode ser realizado em diferentes fluidos e tecidos corporais (sangue, *buffy coat*, medula óssea e baço). Por sua vez, a histopatologia constitui um método muito demorado e requer experiência por parte de quem realiza a análise, mas deve ser realizado sempre que se faz uma citologia pois tem a vantagem de fornecer informação adicional sobre a arquitetura celular



das lesões. [58, 63] Além destes, na questão “Outros”, verificou-se que em dois casos foram feitas análises laboratoriais (2%) e que um outro caso (1%) não possuía informação pois o diagnóstico foi realizado por outro médico veterinário. Apesar de não constituírem métodos de diagnóstico específicos de Lcan, as análises laboratoriais (hematológicas, bioquímicas, urianálise, entre outras) podem ser utilizadas como auxiliares no diagnóstico pois auxiliam o médico veterinário a perceber o estado geral do animal e se existem outros fatores que podem agravar o quadro clínico. [58]

Por fim, observaram-se em quantos casos se utilizaram um ou mais métodos de diagnóstico. Verificou-se que 78,57% dos casos (77 animais) só realizaram um método (serologia *ELISA*), 18,37% (18 animais) realizaram dois métodos e que apenas 3,06% (três animais) realizaram três métodos de diagnóstico associados.

O plano terapêutico aplicado a cada animal pode variar muito consoante o quadro clínico que apresenta, a presença de afeções concomitantes e até mesmo segundo a experiência e formação do médico veterinário que a institui. No entanto existem alguns fármacos e associações terapêuticas que estão referidos e foram questionados neste estudo. Além dos fármacos questionados, colocou-se uma pergunta de resposta aberta (“Outros”) na qual os médicos veterinários responderam com alternativas aos que foram questionados. Após a associação de dados em grupos terapêuticos, realizou-se uma análise descritiva de cada grupo e testes de t-Student para dados emparelhados, para verificar se a diferença entre as médias de T0 e T1 nos diferentes grupos foi significativa.

Verificou-se que os grupos mais utilizados foram Alopurinol em associação com Miltefosina e Alopurinol em associação com Antimoniato de meglumina, com 22 casos cada um (22,5% cada). Estes constituem as associações mais comumente utilizadas (primeira linha) e recomendadas por vários estudos. O Alopurinol por si só constitui um medicamento leishmanioestático, o qual é utilizado principalmente para prevenção de recidivas após a terapêutica inicial. O Antimoniato de meglumina é o composto antimonial mais antigo que possui atividade leishmanicida e demonstra ser muito eficaz, mas devido aos seus efeitos nefrotóxicos e aumento de resistências nos últimos anos tem sido substituído pela Miltefosina. A Miltefosina além de ser de fácil administração (via oral) também demonstrou provocar menos efeitos sobre os rins e fígado (baixa toxicidade), o que permite ser administrada de forma mais segura a animais com doença renal. [74, 75, 88] Desta forma, observou-se que no grupo que utilizou Alopurinol e Miltefosina, a diferença entre as médias de T0 e T1 foi de 0,71682, e que o valor-p foi de 0,020. Estes valores permitiram concluir (com 95% de confiança) que os títulos de Ac ao diagnóstico são maiores que os títulos de Ac após a terapêutica, logo esta terapêutica é eficaz.

Da mesma forma, procedeu-se à observação dos resultados do grupo Alopurinol e Antimoniato de meglumina. Neste grupo observou-se uma diferença entre as médias de T0 e T1 de 0,77455 e um valor-p de 0,018. Também estes valores permitiram concluir o mesmo que sucedeu no grupo anterior.

Na questão “Outros” verificou-se que em 32 casos (32,7%) foram utilizados terapêuticas alternativos em associação com outros grupos de fármacos e que em dois casos (2%) apenas se utilizaram esses terapêuticas alternativos. Os mais utilizados foram: Domperidona em 25 casos (14,7%), Probióticos em três casos (1,8%) e Suplementos Ác. Gordos ômega 3 em dois casos (1,2%). No grupo terapêutico constituído só por “Outros”, verificou-se que a diferença entre as médias foi a mais significativa em comparação com os outros grupos, com 54,74% de diferença entre T0 e T1. No entanto, este grupo só foi constituído por dois casos, e devido ao seu número reduzido não foi possível realizar um teste estatístico para verificar a sua significância estatística.

Em seguida, observou-se que “Alopurinol” de forma isolada e “Alopurinol em associação com Miltefosina e Outros”, foram utilizados em 10 casos cada (10,2%). Nestes verificou-se que: o grupo que utilizou “Alopurinol” teve uma melhoria de 43,15% nos títulos de Ac, bem como um valor-p de 0,001, concluindo-se assim que esta diferença foi estatisticamente significativa; o grupo que utilizou “Alopurinol em associação com Miltefosina e Outros” teve uma melhoria de 9,43% nos títulos de Ac, bem como um valor-p de 0,443, concluindo-se assim que esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Em relação aos outros grupos que também foram considerados estatisticamente significativos, verificaram-se as seguintes associações e distribuições: “Alopurinol e Outros” em oito casos (8,2%), com um valor-p de 0,029; “Alopurinol, Antimoniato de meglumina e Outros” em sete casos (7,1%), com um valor-p de 0,050; “Alopurinol, Antimoniato de meglumina e Imunomoduladores” em cinco casos (5,1%), com um valor-p de 0,050.

Por último, nos grupos que não possuíam número de casos suficientes para serem considerados estatisticamente significativos (e que por isso não aplicaram testes estatísticos nos mesmos), verificaram-se as seguintes distribuições: “Alopurinol, Miltefosina e Imunomoduladores” em três casos (3%); Miltefosina de forma isolada em dois casos (2%); Alopurinol, Miltefosina e Antimoniato de meglumina em dois casos (2%); e “Outros” em dois casos (2%).

## **6. Conclusão:**

Através do estudo realizado e da recolha de informação sobre esta doença, pode-se concluir que não existe um consenso global sobre os melhores procedimentos (métodos de diagnóstico e tipos de terapêutica) a executar. Contudo, deve-se dar ênfase ao papel do médico veterinário e disponibilizar a informação à população para que se diminua o impacto na saúde pública.

Neste estudo observou-se que os animais mais afetados foram os do sexo masculino, revelando que a correlação entre o sexo masculino e a positividade tem importância a nível estatístico. Também se verificou que a Lcan se pode manifestar de diversas formas (com vários sinais clínicos, de forma isolada ou em simultâneo), sendo as alterações cutâneas (68,37%) observadas em mais de 50% dos casos neste estudo. Ainda se constatou que um dos métodos mais utilizados no diagnóstico é a serologia *ELISA* para pesquisa de Ac anti-*Leishmania* (sendo vista em 100% dos casos neste estudo), uma vez que é considerada acessível em termos financeiros e de execução. Por fim, verificou-se que os planos terapêuticos mais utilizados (Alopurinol em associação com Miltefosina e Alopurinol em associação com Antimoniato de meglumina) possuíram eficácia na redução dos títulos de Ac anti-*Leishmania*, e por isso podemos inferir que esta diminuição se reflete numa melhoria dos sinais clínicos e do estado geral dos animais, tal como se verificou em estudos anteriores. Além destes, notou-se que apesar do grupo constituído por “Outros” ter sido o mais eficaz na redução dos títulos de Ac (54,74%), este não foi considerado estatisticamente significativo por possuir um número muito reduzido de animais.

Infelizmente nem todos os objetivos deste estudo foram cumpridos, pois o número reduzido, a distribuição desigual de casos, e a falta de informações sobre análises bioquímicas e proteinogramas posteriores ao diagnóstico, não permitiram a previsão de padrões que possam auxiliar no prognóstico da doença. Além destes, a falta de informação sobre a história clínica (prevenção e doenças concomitantes) e o melhoramento do estado geral dos animais após o início da terapêutica condicionaram um pouco este estudo.

Uma vez que a doença renal e as patologias hepáticas estão relacionadas com a Lcan e são bastante complexas, seria interessante (do ponto de vista da autora) a realização de estudos futuros sobre cada um destes tópicos. Estes poderiam focar-se no estudo da variação de enzimas (renais e hepáticas) e como esta poderia ser indicador de um melhor ou pior prognóstico de Lcan. Outros estudos sobre como a terapêutica leishmanicida poderia contribuir para uma melhoria do quadro clínico do paciente renal/hepático ou para a evolução de proteinogramas poderiam ser tópicos interessantes a explorar.

Conclui-se no entanto que ainda há um longo percurso a explorar, seja no desenvolvimento de novos métodos ou aperfeiçoamento de alguns já existentes, bem como no desenvolvimento de medidas preventivas mais eficazes (repelentes, vacinas, entre outras) que nos permitam ter esperança de um dia encontrar uma cura para esta doença.

## **Bibliografia:**

1. Muller, I.K., Pascale, *Kinetoplastids*, in *Immunity to parasitic infection*, T. Lamb, Editor. 2012, John Wiley & Sons. p. 153-164.
2. Gramiccia, M., *Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis*. Veterinary parasitology, 2011. **181**(1): p. 23-30.
3. Baneth, G.S.-G., Laia *Leishmaniasis*, in *Infectious diseases of the dog and cat*, C.E. Greene, Editor. 2012, Elsevier Health Sciences. p. 734-749.
4. Maroli, M., M.D. Feliciangeli, L. Bichaud, R.N. Charrel, and L. Gradoni, *Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern*. Medical and Veterinary Entomology, 2013. **27**(2): p. 123-147.
5. Ready, P.D., *Epidemiology of visceral leishmaniasis*. Clin Epidemiol, 2014. **6**: p. 147-54.
6. Maia, C., R. Parreira, J.M. Cristóvão, F.B. Freitas, M.O. Afonso, and L. Campino, *Molecular detection of Leishmania ADN and identification of blood meals in wild caught phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from southern Portugal*. Parasites & vectors, 2015. **8**(1): p. 173.
7. Cardoso, L., C. Mendão, and L.M. de Carvalho, *Prevalence of Dirofilaria immitis, Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma spp. and Leishmania infantum in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal-a national serological study*. Parasites & vectors, 2012. **5**(1): p. 62.
8. Branco, S., C. Alves-Pires, C. Maia, S. Cortes, J. Cristóvão, L. Gonçalves, L. Campino, and M. Afonso, *Entomological and ecological studies in a new potential zoonotic leishmaniasis focus in Torres Novas municipality, Central Region, Portugal*. Acta tropica, 2013. **125**(3): p. 339-348.
9. Naucke, T., B. Menn, D. Massberg, and S. Lorentz, *Sandflies and leishmaniasis in Germany*. Parasitology research, 2008. **103**(1): p. 65-68.
10. Miranda, S., X. Roura, A. Picado, L. Ferrer, and A. Ramis, *Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs*. Research in Veterinary Science, 2008. **85**(1): p. 35-38.
11. Morillas, F., F.S. Rabasco, J. Ocaña, J. Martin-Sanchez, J. Ocaña-Wihelmi, C. Acedo, and M. Sanchiz-Marin, *Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector*. Parasitology research, 1996. **82**(6): p. 569-570.
12. Maia, C., M. Afonso, L. Neto, L. Dionísio, and L. Campino, *Molecular detection of Leishmania infantum in naturally infected Phlebotomus perniciosus from Algarve region, Portugal*. Journal of vector borne diseases, 2009. **46**(4): p. 268.
13. Mehlhorn, H., *Encyclopedia of parasitology: AM*. Vol. 1. 2008: Springer Science & Business Media.

14. Abonnenc, E., *Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae)*. 1972.
15. Naucke, T.J. and S. Lorentz, *First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany*. *Parasites & vectors*, 2012. **5**(1): p. 67.
16. Ferreira, M.G.P.A., K.R. Fattori, F. Souza, and V.M.F. Lima, *Potential role for dog fleas in the cycle of Leishmania spp.* *Veterinary parasitology*, 2009. **165**(1): p. 150-154.
17. Solano-Gallego, L., L. Rossi, A.M. Scroccaro, F. Montarsi, M. Caldin, T. Furlanello, and M. Trotta, *Detection of Leishmania infantum ADN mainly in Rhipicephalus sanguineus male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis*. *Parasites & Vectors*, 2012. **5**(1): p. 98.
18. Salvatore, D., S. Aureli, R. Baldelli, A. Di Francesco, M.P. Tampieri, and R. Galuppi, *Molecular evidence of Leishmania infantum in Ixodes ricinus ticks from dogs and cats, in Italy*. *Veterinaria italiana*, 2014. **50**(4): p. 307-312.
19. Dantas-Torres, F., M.S. Latrofa, and D. Otranto, *Quantification of Leishmania infantum ADN in females, eggs and larvae of Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & vectors*, 2011. **4**(1): p. 56.
20. Dantas-Torres, F., V. Lorusso, G. Testini, M. de Paiva-Cavalcanti, L.A. Figueredo, D. Stanneck, N. Mencke, S.P. Brandão-Filho, L.C. Alves, and D. Otranto, *Detection of Leishmania infantum in Rhipicephalus sanguineus ticks from Brazil and Italy*. *Parasitology research*, 2010. **106**(4): p. 857-860.
21. Silva, F.L., R.G. Oliveira, T.M. Silva, M.N. Xavier, E.F. Nascimento, and R.L. Santos, *Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis*. *Veterinary parasitology*, 2009. **160**(1): p. 55-59.
22. de Freitas, E., M.N. Melo, A.P. da Costa-Val, and M.S.M. Michalick, *Transmission of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors*. *Veterinary Parasitology*, 2006. **137**(1): p. 159-167.
23. Quinnell, R.J. and O. Courtenay, *Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis*. *Parasitology*, 2009. **136**(14): p. 1915-1934.
24. Brandão-Filho, S.P., M.E. Brito, F.G. Carvalho, E.A. Ishikawa, E. Cupolillo, L. Floeter-Winter, and J.J. Shaw, *Wild and synanthropic hosts of Leishmania (Viannia) braziliensis in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2003. **97**(3): p. 291-296.
25. Poli, A., F. Abramo, P. Barsotti, S. Leva, M. Gramiccia, A. Ludovisi, and F. Mancianti, *Feline leishmaniosis due to Leishmania infantum in Italy*. *Veterinary parasitology*, 2002. **106**(3): p. 181-191.
26. Martín-Sánchez, J., C. Acedo, M. Muñoz-Pérez, B. Pesson, O. Marchal, and F. Morillas-Márquez, *Infection by Leishmania infantum in cats: epidemiological study in Spain*. *Veterinary parasitology*, 2007. **145**(3): p. 267-273.

27. Sobrino, R., E. Ferroglio, A. Oleaga, A. Romano, J. Millan, M. Revilla, M. Arnal, A. Trisciuglio, and C. Gortázar, *Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain*. Veterinary parasitology, 2008. **155**(3): p. 198-203.
28. Mohebbali, M., H. Hajjarian, Y. Hamzavi, I. Mobedi, S. Arshi, Z. Zarei, B. Akhoundi, K.M. Naeini, R. Avizeh, and M. Fakhari, *Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran*. Veterinary Parasitology, 2005. **129**(3): p. 243-251.
29. Zhang, J.-R., X.-G. Guo, J.-L. Liu, T.-H. Zhou, X. Gong, D.-L. Chen, and J.-P. Chen, *Molecular detection, identification and phylogenetic inference of Leishmania spp. in some desert lizards from Northwest China by using internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences*. Acta Tropica, 2016. **162**: p. 83-94.
30. Molina, R., M.I. Jiménez, I. Cruz, A. Iriso, I. Martín-Martín, O. Sevillano, S. Melero, and J. Bernal, *The hare (Lepus granatensis) as potential sylvatic reservoir of Leishmania infantum in Spain*. Veterinary Parasitology, 2012. **190**(1-2): p. 268-271.
31. Kuhls, K., C. Chicharro, C. Cañavate, S. Cortes, L. Campino, C. Haralambous, K. Soteriadou, F. Pratlong, J.-P. Dedet, and I. Mauricio, *Differentiation and gene flow among European populations of Leishmania infantum MON-1*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(7): p. e261.
32. Cardoso, L., H. Santos, A. Cordeiro-da-Silva, F. Pratlong, J.-P. Dedet, and M. Rodrigues, *Leishmania infantum MON-98: infection in a dog from Alto Douro, Portugal*. Acta tropica, 2002. **83**(1): p. 83-85.
33. Campino, L., F. Pratlong, P. Abranches, J.A. Rioux, G. Santos-Gomes, C. Alves-Pires, S. Cortes, J. Ramada, J. Cristovão, and M. Afonso, *Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of Leishmania infantum based on the identification of 213 strains*. Tropical Medicine & International Health, 2006. **11**(11): p. 1708-1714.
34. Cortes, S., I. Mauricio, A. Almeida, J.M. Cristovão, F. Pratlong, J.P. Dedet, and L. Campino, *Application of kADN as a molecular marker to analyse Leishmania infantum diversity in Portugal*. Parasitology international, 2006. **55**(4): p. 277-283.
35. Takken, W. and B.G. Knols, *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*. Vol. 1. 2007: Wageningen Academic Pub.
36. Bates, P.A., *Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies*. International journal for parasitology, 2007. **37**(10): p. 1097-1106.
37. Gossage, S.M., M.E. Rogers, and P.A. Bates, *Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle*. International journal for parasitology, 2003. **33**(10): p. 1027-1034.
38. Kamhawi, S., *Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?* Trends in parasitology, 2006. **22**(9): p. 439-445.
39. Handman, E. and D.V. Bullen, *Interaction of Leishmania with the host macrophage*. Trends in parasitology, 2002. **18**(8): p. 332-334.

40. Cordero del Campillo, M., *Parasitología veterinaria*. 1º ed. 1999, Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
41. Sanchez-Robert, E., L. Altet, A. Sanchez, and O. Francino, *Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study*. Journal of Heredity, 2005. **96**(7): p. 755-758.
42. Ritter, U., F. Frischknecht, and G. van Zandbergen, *Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites?* Trends in parasitology, 2009. **25**(11): p. 505-510.
43. Saridomichelakis, M.N., *Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications*. Veterinary dermatology, 2009. **20**(5-6): p. 471-489.
44. Miranda, S., S. Martorell, M. Costa, L. Ferrer, and A. Ramis, *Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol*. Veterinary parasitology, 2007. **144**(3): p. 251-260.
45. Carrillo, E. and J. Moreno, *Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis*. Veterinary immunology and immunopathology, 2009. **128**(1): p. 67-70.
46. Solano-Gallego, L., S. Montserrat-Sangrà, L. Ordeix, and P. Martínez-Orellana, *Leishmania infantum-specific production of IFN- $\gamma$  and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniasis*. Parasites & vectors, 2016. **9**(1): p. 317.
47. Gantt, K.R., S. Schultz-Cherry, N. Rodriguez, S.M. Jeronimo, E.T. Nascimento, T.L. Goldman, T.J. Recker, M.A. Miller, and M.E. Wilson, *Activation of TGF- $\beta$  by Leishmania chagasi: importance for parasite survival in macrophages*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(5): p. 2613-2620.
48. Ordeix, L., A. Dalmau, M. Osso, J. Llull, S. Montserrat-Sangrà, and L. Solano-Gallego, *Histological and parasitological distinctive findings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with different clinical stages of leishmaniasis*. Parasites & vectors, 2017. **10**(1): p. 121.
49. Rallis, T., M. Day, M. Saridomichelakis, K. Adamama-Moraitou, L. Papazoglou, A. Fytianou, and A. Koutinas, *Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis (Leishmania infantum): a clinicopathological study of 26 cases*. Journal of comparative pathology, 2005. **132**(2): p. 145-152.
50. Pinto, A.J., M.M. Figueiredo, F.L. Silva, T. Martins, M.S. Michalick, W.L. Tafuri, and W.L. Tafuri, *Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with Leishmania infantum*. Acta Veterinaria Scandinavica, 2011. **53**(1): p. 67.
51. Ferraro, G.C., G.F. Machado, M.D. Laurenti, M.H.B. de Camargo, A.A.D. Gomes, D.C. Costa, C.M. Vieira, C.B. Simões, V.M.F. de Lima, and M. Marcondes, *Alterações eletromiográficas e histopatológicas da musculatura de cães naturalmente infectados por Leishmania infantum*. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 2012. **49**(5): p. 404-413.

52. Santos, M., R. Marcos, M. Assunção, and A.J. Matos, *Polyarthrititis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog*. Veterinary parasitology, 2006. **141**(3): p. 340-344.
53. Koutinas, A. and C. Koutinas, *Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to Leishmania infantum/chagasi*. Veterinary Pathology Online, 2014. **51**(2): p. 527-538.
54. Roze, M., *Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment*. Eur J Comp Anim Pract, 2005. **15**: p. 39-52.
55. Koutinas, A.F., Z.S. Polizopoulou, M.N. Saridomichelakis, D. Argyriadis, A. Fytianou, and K.G. Plevraki, *Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996)*. Journal of the American Animal Hospital Association, 1999. **35**(5): p. 376-383.
56. Cortadellas, O., M.J.F. del Palacio, A. Bayón, A. Albert, and J. Talavera, *Systemic Hypertension in Dogs with Leishmaniasis: Prevalence and Clinical Consequences*. Journal of Veterinary Internal Medicine, 2006. **20**(4): p. 941-947.
57. Ciaramella, P., G. Oliva, R. De Luna, L. Gradoni, R. Ambrosio, L. Cortese, A. Scalone, and A. Persechino, *A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum*. Veterinary record, 1997. **141**: p. 539-543.
58. Paltrinieri, S., L. Gradoni, X. Roura, A. Zatelli, and E. Zini, *Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis*. Veterinary clinical pathology, 2016. **45**(4): p. 552-578.
59. Paltrinieri, S., L. Solano-Gallego, A. Fondati, G. Lubas, L. Gradoni, M. Castagnaro, A. Crotti, M. Maroli, G. Oliva, and X. Roura, *Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 2010. **236**(11): p. 1184-1191.
60. Solano-Gallego, L., G. Miró, A. Koutinas, L. Cardoso, M.G. Pennisi, L. Ferrer, P. Bourdeau, G. Oliva, and G. Baneth, *LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis*. Parasites & vectors, 2011. **4**(1): p. 86.
61. Noli, C. and M.N. Saridomichelakis, *An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by Leishmania infantum (syn. L. chagasi)*. The Veterinary Journal, 2014. **202**(3): p. 425-435.
62. Saridomichelakis, M.N., M.E. Mylonakis, L.S. Leontides, A.F. Koutinas, C. Billinis, and V.I. Kontos, *Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (Leishmania infantum) in symptomatic and asymptomatic dogs*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2005. **73**(1): p. 82-86.
63. Miro, G., L. Cardoso, M.G. Pennisi, G. Oliva, and G. Baneth, *Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two*. Trends in parasitology, 2008. **24**(8): p. 371-377.



64. Maia, C. and L. Campino, *Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection*. Veterinary parasitology, 2008. **158**(4): p. 274-287.
65. *Formas promastigotas de Leishmania spp. IFI*. [cited 2017 05-05-2017]; Available from: [https://www.google.pt/search?q=Leishmania+ifi&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjh57\\_WidTUAhVMHxoKHSU5A5IQ\\_AUICigB&biw=1536&bih=735#imgsrc=qrWQHgsM9fTFUM:](https://www.google.pt/search?q=Leishmania+ifi&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjh57_WidTUAhVMHxoKHSU5A5IQ_AUICigB&biw=1536&bih=735#imgsrc=qrWQHgsM9fTFUM:).
66. Hnasko, R., *ELISA*. 2015: Springer.
67. Mettler, M., F. Grimm, G. Capelli, H. Camp, and P. Deplazes, *Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs*. Journal of clinical microbiology, 2005. **43**(11): p. 5515-5519.
68. Solano-Gallego, L., S. Villanueva-Saz, M. Carbonell, M. Trotta, T. Furlanello, and A. Natale, *Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and Leishmania 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT*. Parasites & vectors, 2014. **7**(1): p. 111.
69. Reguera, R.M., M. Morán, Y. Pérez-Pertejo, C. García-Estrada, and R. Balaña-Fouce, *Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis*. Veterinary parasitology, 2016. **227**: p. 98-114.
70. Leonard, R., J. Hardy, G. Van Tienhoven, S. Houston, P. Simmonds, M. David, and J. Mansi, *Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2001. **19**(21): p. 4150-4159.
71. Sindermann, H. and J. Engel, *Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2006. **100**(Supplement\_1): p. S17-S20.
72. Proverbio, D., E. Spada, G. Bagnagatti De Giorgi, and R. Perego, *Failure of Miltefosine Treatment in Two Dogs with Natural Leishmania infantum Infection*. Case Reports in Veterinary Medicine, 2014. **2014**.
73. Manna, L., F. Vitale, S. Reale, E. Picillo, G. Neglia, F. Vescio, and A.E. Gravino, *Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis*. The Veterinary Journal, 2009. **182**(3): p. 441-445.
74. Mateo, M., L. Maynard, C. Vischer, P. Bianciardi, and G. Miró, *Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis*. Parasitology research, 2009. **105**(1): p. 155.
75. Torres, M., M. Bardagí, X. Roura, G. Zanna, I. Ravera, and L. Ferrer, *Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol*. The veterinary journal, 2011. **188**(3): p. 346-351.

76. Nelson, D.J., C. Bugge, G.B. Elion, R.L. Berens, and J.J. Marr, *Metabolism of pyrazolo (3, 4-d) pyrimidines in Leishmania braziliensis and Leishmania donovani. Allopurinol, oxipurinol, and 4-aminopyrazolo (3, 4-d) pyrimidine*. Journal of Biological Chemistry, 1979. **254**(10): p. 3959-3964.
77. Torres, M., J. Pastor, X. Roura, M. Tabar, Y. Espada, A. Font, J. Balasch, and M. Planellas, *Adverse urinary effects of allopurinol in dogs with leishmaniasis*. Journal of Small Animal Practice, 2016. **57**(6): p. 299-304.
78. Manna, L., S. Reale, E. Picillo, F. Vitale, and A.E. Gravino, *Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ), IL4 expression levels and Leishmania ADN load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol*. Cytokine, 2008. **44**(2): p. 288-292.
79. Cavaliero, T., P. Arnold, A. Mathis, T. Glaus, R. Hofmann-Lehmann, and P. Deplazes, *Clinical, Serologic, and Parasitologic Follow-Up after Long-Term Allopurinol Therapy of Dogs Naturally Infected with Leishmania infantum*. Journal of veterinary internal medicine, 1999. **13**(4): p. 330-334.
80. Majumder, B., R. Biswas, and U. Chattopadhyay, *Prolactin regulates antitumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12*. International journal of cancer, 2002. **97**(4): p. 493-500.
81. Gómez-Ochoa, P., D. Sabate, J. Homedes, and L. Ferrer, *Use of the nitroblue tetrazolium reduction test for the evaluation of Domperidone effects on the neutrophilic function of healthy dogs*. Veterinary immunology and immunopathology, 2012. **146**(1): p. 97-99.
82. Croft, S. and P. Olliaro, *Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities*. Clinical Microbiology and Infection, 2011. **17**(10): p. 1478-1483.
83. Chawla, B., A. Jhingran, A. Panigrahi, K.D. Stuart, and R. Madhubala, *Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin-susceptible-resistant Leishmania donovani*. PloS one, 2011. **6**(10): p. e26660.
84. Belloli, C., G. Crescenzo, S. Carli, A. Zaghini, G. Mengozzi, S. Bertini, and P. Ormas, *Disposition of antimony and aminosidine combination after multiple subcutaneous injections in dogs*. The Veterinary Journal, 1999. **157**(3): p. 315-321.
85. Poli, A., S. Sozzi, G. Grazia, P. Bandinelli, and F. Mancianti, *Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis*. Veterinary parasitology, 1997. **71**(4): p. 263-271.
86. Athanasiou, L., M. Saridomichelakis, V. Kontos, G. Spanakos, and T. Rallis, *Treatment of canine leishmaniosis with aminosidine at an optimized dosage regimen: A pilot open clinical trial*. Veterinary parasitology, 2013. **192**(1): p. 91-97.
87. Ramos, H., E. Valdivieso, M. Gamargo, F. Dagger, and B. Cohen, *Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions*. Journal of Membrane Biology, 1996. **152**(1): p. 65-75.

88. Noli, C. and S.T. Auxilia, *Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review*. Veterinary dermatology, 2005. **16**(4): p. 213-232.
89. Oliva, G., L. Gradoni, P. Ciaramella, R.D. Luna, L. Cortese, S. Orsini, R. Davidson, and A. Persechino, *Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with Leishmania infantum*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1995. **36**(6): p. 1013-1019.
90. Rougier, S., I. Vouldoukis, S. Fournel, S. Pérès, and F. Woehrlé, *Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniasis: a pilot study*. Veterinary parasitology, 2008. **153**(3): p. 244-254.
91. Rougier, S., L. Hasseine, P. Delaunay, G. Michel, and P. Marty, *One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniasis*. Veterinary parasitology, 2012. **186**(3): p. 245-253.
92. Kumar, R. and C. Engwerda, *Vaccines to prevent leishmaniasis*. Clinical & Translational Immunology, 2014. **3**(3): p. e13.
93. Foroughi-Parvar, F. and G.R. Hatam, *Vaccines for Canine Leishmaniasis*. Vol. 2014. 2014. 569193.
94. Coler, R.N. and S.G. Reed, *Second-generation vaccines against leishmaniasis*. Trends in parasitology, 2005. **21**(5): p. 244-249.
95. Gurunathan, S., D.M. Klinman, and R.A. Seder, *ADN vaccines: immunology, application, and optimization*. Annual review of immunology, 2000. **18**(1): p. 927-974.
96. *Nota técnica: Suspensão Leishmune*. 10-06-2017]; Available from: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/arquivos/nota-tecnica-dfip-38-14-leishmune.pdf/view>.
97. Moreno, J., I. Vouldoukis, V. Martin, D. McGahie, A.-M. Cuisinier, and S. Gueguen, *Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs*. PLoS neglected tropical diseases, 2012. **6**(6): p. e1683.
98. Bourdoiseau, G., C. Hugnet, R.B. Gonçalves, F. Vézilier, E. Petit-Didier, G. Papierok, and J.-L. Lemesre, *Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs*. Veterinary immunology and immunopathology, 2009. **128**(1): p. 71-78.
99. Oliva, G., J. Nieto, V.F. Manzano, S. Cappiello, E. Fiorentino, T. Di Muccio, A. Scalone, J. Moreno, C. Chicharro, and E. Carrillo, *A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two Leishmania infantum transmission seasons*. PLoS neglected tropical diseases, 2014. **8**(10): p. e3213.
100. Moreno, J., I. Vouldoukis, P. Schreiber, V. Martin, D. McGahie, S. Gueguen, and A.-M. Cuisinier, *Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later*. Veterinary immunology and immunopathology, 2014. **158**(3): p. 199-207.

101. Martin, V., I. Vouldoukis, J. Moreno, D. McGahie, S. Gueguen, and A.-M. Cuisinier, *The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later*. Veterinary research, 2014. **45**(1): p. 69.
102. Miró, G., C. Petersen, L. Cardoso, P. Bourdeau, G. Baneth, L. Solano-Gallego, M.G. Pennisi, L. Ferrer, and G. Oliva, *Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis*. Trends in Parasitology, 2017.
103. Solano-Gallego, L., L. Cardoso, M.G. Pennisi, C. Petersen, P. Bourdeau, G. Oliva, G. Miró, L. Ferrer, and G. Baneth, *Diagnostic Challenges in the Era of Canine Leishmania infantum Vaccines*. Trends in Parasitology, 2017.
104. Otranto, D. and F. Dantas-Torres, *The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health*. Trends in parasitology, 2013. **29**(7): p. 339-345.
105. Schlein, Y., R.L. Jacobson, and G.C. Müller, *Sand fly feeding on noxious plants: a potential method for the control of leishmaniasis*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2001. **65**(4): p. 300-303.
106. de Arias, A.R., G. Schmeda-Hirschmann, and A. Falcao, *Feeding deterrency and insecticidal effects of plant extracts on Lutzomyia longipalpis*. Phytotherapy Research, 1992. **6**(2): p. 64-67.
107. Oshaghi, M., R. Ghalandari, H. Vatandoost, M. Shayeghi, M. Kamali-Nejad, H. Tourabi-Khaledi, M. Abolhassani, and M. Hashemzadeh, *Repellent effect of extracts and essential oils of Citrus limon (Rutaceae) and Melissa officinalis (Labiatae) against main malaria vector, Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae)*. Iranian Journal of Public Health, 2003. **32**(4): p. 47-52.
108. Fradin, M.S. and J.F. Day, *Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites*. New England Journal of Medicine, 2002. **347**(1): p. 13-18.
109. Otranto, D., D. De Caprariis, R. Lia, V. Tarallo, V. Lorusso, G. Testini, F. Dantas-Torres, S. Latrofa, P. Diniz, and N. Mencke, *Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study*. Veterinary parasitology, 2010. **172**(3): p. 323-332.
110. Kit ELISA Leiscan. 13-07-2017]; Available from: <http://www.ecuphar.es/ficha-producto.php?pid=2587>.
111. Weiser, G., *Sample collection, processing, and analysis of laboratory service options*. Veterinary hematology and clinical chemistry, 2nd edn. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2012: p. 32-39.
112. Ciaramella, P., G. Oliva, R.D. Luna, L. Gradoni, R. Ambrosio, L. Cortese, A. Scalone, and A. Persechino, *A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum*. Vet Rec, 1997. **141**(21): p. 539-43.

113. Valentine, B.A., J.T. Blue, S.M. Shelley, and B.J. Cooper, *Increased serum alanine aminotransferase activity associated with muscle necrosis in the dog*. Journal of Veterinary Internal Medicine, 1990. **4**(3): p. 140-143.
114. de Oliveira, T.S., M. Noro, F. da Rocha Ebling, G. Lugocho, and D.F. Bicca, *Associação entre as proteínas plasmáticas em cães*. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2017. **8**(2).
115. Tvedten, H. and M.D. Willard, *Immunologic and Plasma Protein Disorders*, in *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*, SAUNDERS, Editor. 2004, Elsevier (USA). p. 290-305.
116. Adamama-Moraitou, K.K., T.S. Rallis, A.F. Koytinas, D. Tontis, K. Plevraki, and M. Kritsepi, *Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with Leishmania infantum: a prospective study*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2007. **76**(1): p. 53-57.

### Anexos:

#### **Anexo 1** – Inquéritos realizados aos CAMV's que enviaram as amostras dos casos positivos

1. Nome do animal: \_\_\_\_\_
2. Idade do Animal: \_\_\_\_\_
3. Raça do Animal: \_\_\_\_\_
4. Sexo do animal: (Marcar apenas uma oval.)
  - a. ☐ Masculino
  - b. ☐ Feminino
5. Quais os sinais clínicos no momento de diagnóstico? (Marque todas que se aplicam)
  - a. ☐ Linfadenomegália
  - b. ☐ Alterações cutâneas (Hiperqueratose, despigmentação, dermatite, etc.)
  - c. ☐ Perda de Peso
  - d. ☐ Onicogrifose (crescimento das unhas)
  - e. ☐ Anorexia
  - f. ☐ Lesões oculares (blefarite, conjuntivite, uveíte)
  - g. ☐ Diarreia crónica
  - h. ☐ Epistaxis
  - i. ☐ Alterações locomotoras (Poliartrite, sinovite, periostite, osteomielite)
  - j. ☐ Alterações neurológicas (Ataxia, paralisia, parésia, convulsões, neuralgia)
  - k. ☐ Outros
6. Se respondeu “Outros” na questão anterior, indique quais:  
\_\_\_\_\_
7. Qual a data em que foi feito o diagnóstico? \_\_\_\_\_
8. Quais os métodos de diagnóstico utilizados? (Marque todas que se aplicam)
  - a. ☐ Serologia *ELISA* (Leiscan)
  - b. ☐ Imunofluorescência Indireta
  - c. ☐ Citologia (punção de medula óssea, linfonodos, lesões, massas)
  - d. ☐ Histopatologia (exérese de lesões, massas)
  - e. ☐ PCR
  - f. ☐ Outros

9. Se respondeu "Outros na questão anterior, indique quais:

---

10. Qual a terapêutica efetuado até ao momento? (Marque todas que se aplicam)

- a. ☐ Antimoniato de N. metil glucamina (Glucantime®)
- b. ☐ Estibogluconato de sódio (Penstostan®)
- c. ☐ Antibióticos (Pentamidina, Anfotericina B, Aminosidina)
- d. ☐ Derivados do Imidazol (Metronidazol, Ketoconazol, Itraconazol, Secnidazol)
- e. ☐ Alopurinol
- f. ☐ Herbicida Dinitroanilina (Trifuralina)
- g. ☐ Miltefosina (Milteforan®)
- h. ☐ Imunomoduladores (Prednisona, Prednisolona, Levamizol)
- i. ☐ Interferão Gama
- j. ☐ Outros

11. Se respondeu "Outros" na questão anterior, indique quais:

---

12. Indique a data de início da terapêutica e data de fim da terapêutica:

---